

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

Epidemiología de la besnoitiosis bovina en España

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Daniel Gutiérrez Expósito

Directores

Gema Álvarez García
Luis Miguel Ortega Mora

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



EPIDEMIOLOGÍA DE
LA BESNOITIOSIS BOVINA
EN ESPAÑA

Tesis Doctoral
Daniel Gutiérrez Expósito
Madrid, 2016

Memoria presentada por Don Daniel Gutiérrez Expósito para optar
al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid

Madrid, 8 de febrero de 2016

Dña. Gema Álvarez García, Doctora en Veterinaria y Profesora Titular adscrita al Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid y D. Luis Miguel Ortega Mora, Doctor en Veterinaria y Catedrático de Universidad adscrito al Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada: **“Epidemiología de la besnoitiosis bovina en España”** que presenta el Licenciado en Veterinaria D. Daniel Gutiérrez Expósito, para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada en las dependencias del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid bajo su supervisión y cumple todas las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

De acuerdo con la normativa vigente, firmamos el presente certificado, autorizando su presentación como directores de la mencionada Tesis Doctoral.

En Madrid, a 8 de febrero de 2016

Fdo. Dra. Gema Álvarez García

Fdo. Dr. Luis Miguel Ortega Mora

La carrera científica, apta solo para entusiastas

¿Qué significa vivir con entusiasmo?

Ponerse metas elevadas

No desfallecer nunca ante la adversidad

Mantener siempre un espíritu de mejora continua

Contagiar de positividad nuestro alrededor

Practicar una predisposición creativa

Ver las contrariedades como experiencias

Comprometerse

Ser proactivo, no reactivo

Aplicar la famosa frase: YES, WE CAN

Gonzalo Giner

Veterinario y escritor

Agradecimientos

Es ahora, viendo la luz al final del túnel, cuando toca echar la vista atrás y dar las gracias a todas aquellas personas que han contribuido en mayor o menor medida a que este largo trabajo saliera adelante y diera sus frutos. Espero no dejarme a nadie en éstas líneas.

En primer lugar quiero dar las gracias a mis directores, Gema y Luis, por haber apostado por mí y haberme dado su confianza desde el principio. Gema, gracias por toda tu paciencia, tu comprensión y tu capacidad de trabajo. Gracias por tu gran calidad humana y profesional. Espero haber aprendido todo lo que me has enseñado en estos años. Ha sido una suerte tenerte como directora. Luis, gracias por despertar en mí el interés por los parásitos y la investigación durante aquellas clases de enfermedades parasitarias, hace ya más de siete años. Son muchas las enseñanzas que me llevo. Tu entusiasmo, tu vocación y tu perseverancia son admirables. Gracias también por tu optimismo y tu buen hacer en el trabajo. Siempre me sentiré orgulloso de haber formado parte ese gran grupo que diriges y has conseguido dar forma: SALUVET.

También al resto de la cúpula saluvetiana: Esther, Ignacio, Javier y Mercedes. Gracias de corazón por todas vuestras enseñanzas y consejos, sois un ejemplo de profesionalidad y compañerismo.

Gracias a los vecinos de enfrente: Isabel, Chema, Cinta, Lobo, Fran y Laura, por vuestro afecto y vuestra disponibilidad.

A mis mentores en la poyata: Adri, Vir, Elena, Silvia, Moreno y Claudia. Gracias por vuestra disposición y paciencia en mis inicios, se que la formación de los recién llegados no siempre es fácil. Gracias a Adri, por enseñarme a

preguntarme siempre el porqué de las cosas, a Vir, por tu coraje y tus ganas de vivir la vida, a Elena, por tu constancia en el trabajo, a Silvia, por tu perfeccionismo, a Moreno, por compartir cada día tus bromas y dar vida a la rutina en el laboratorio, a Claudia, por contagiarnos tu felicidad.

Gracias también a Vane, Alba, Carmen y Ali por todo lo que me habéis enseñado, por vuestra dedicación y por los buenos ratos que me habéis hecho pasar en el laboratorio. El buen ambiente en el trabajo es indispensable para que las cosas salgan bien y vosotras habéis contribuido a ello. Gracias también a Eva, por saludarme con una sonrisa cada mañana.

Gracias a las tres secretarias del grupo con las que he coincidido: Ofe, Joaqui y Lola. ¿Qué haríamos sin vosotras? Gracias por ayudarme siempre que lo he necesitado, me llevo un grato recuerdo de todas.

A mis compañeros de hornada: Paula, Iván y David, con los que más tiempo he pasado en todos estos años. Gracias a Paula, por enseñarme tantas cosas con tanta paciencia y ayudarme con todo, a Iván, por solucionarme cualquier problema (científico o no) y a David, por tu tranquilidad y tu capacidad para hacer fácil lo difícil.

A la new generation, por haber rejuvenecido al grupo y haber traído alegría y entusiasmo al laboratorio. Gracias a Rober, por tu espontaneidad, a Alex, por ser un amigo dentro y fuera del laboratorio, a Carlos, por tu sentido del humor, tu compañerismo y buen rollo, a Laura, por tu profesionalidad y tu amistad y a Marta, por tu sencillez y esa disposición a echar una mano siempre y en cualquier momento.

También a los últimos fichajes post-docs: Pilar, Dani, María y Patri. Gracias por toda vuestra ayuda y por los buenos ratos que me habéis hecho pasar.

Gracias a todos lo que desde diferentes partes del mundo, han pasado por SALUVET y con lo que he tenido la suerte de coincidir, de todos he aprendido algo y de todos me llevo un bonito recuerdo. De Argentina: Andrea, Yanina, Lumi, Lucía, Marcelo y Nacho. De Méjico: Paty y Adrián. De Brasil: Waggner, Junior y Pomy. De Italia: Alessia. De Suiza: Carol.

A los fotógrafos Ana, Dani y Moreno, gracias por haberme cedido algunas de vuestras fotos para incluirlas en esta tesis, espero que os guste la selección!

Gracias también al personal de la hemeroteca, especialmente a Carmen y Mar, por ser tan eficaces y profesionales. Gracias por conseguirme todos los artículos, que no fueron pocos.

I'm deeply in debt to Varda Shkap, Mónica Mazuz, Ricardo Wolkomirsky, Elena Blinder, Roni King, Igor, Alex, Benjamin, Oran, Asael, Thea, Luda and all the people from the Kimron Veterinary Institute of Israel. I thank you for your help during my stay in Israel and for the worthy and joyful time I shared with all of you. I'm very grateful for the hospitality received from you and the rest of the people from the "Majon":

רבה תודה

A mis amigos de la infancia, Jose, Joni, Sheila, Debo, Alberto, Paloma, Lydia y Davinia.

Porque sé que puedo contar siempre con vosotros. Gracias por haberme acompañado en toda esta etapa y haber compartido conmigo tantos buenos momentos.

A los habichuelos, la familia que he elegido y de la que me siento tan afortunado. Adri, Alvaro, Ana, Puni, Arancha, Charly, Chinchí, Guada, Guille, Inés, Plume, Patri, Jorge, Mache, Marcos, Marta, Mer, Merche, Noe, Roci, Sillo y Silvia. Sin vosotros no habría llegado hasta aquí. Gracias por haberme regalado vuestra amistad incondicionalmente, durante la carrera y después de ella. Tras seis años como licenciados seguimos igual que al principio. Gracias por aguantar mis agobios y mi estrés durante todo este tiempo.

Finalmente quiero dar las gracias a toda mi familia, en especial a los que ya no están, sé que estáis orgullosos de vuestro nieto desde allí arriba. A mi madre, por estar siempre ahí, por cuidarme y preocuparse por mí en todo momento. A mi padre, por todo su esfuerzo. A mi hermano, por su confianza y fé puestas en mí. A mi abuelo por ser un ejemplo de constancia y trabajo. A mis tíos y primos, por todo vuestro apoyo. También a ti Piki, por tus saludos al llegar a casa y tu fidelidad.

Con esta tesis se acaba una etapa de mi vida y comienza otra, aunque incierta por ahora... Solo espero seguir en contacto con todos vosotros.

A todos: Mi más sincero GRACIAS

El médico cura al hombre, el veterinario a la humanidad
Louis Pasteur

ÍNDICE

INDICE GENERAL

INDICE DE ABREVIATURAS.....	v
INDICE DE CUADROS.....	vi
INDICE DE TABLAS	vii
INDICE DE FIGURAS	ix
CAPÍTULO I: RESUMEN / SUMMARY	1
CAPÍTULO II: INTRODUCCIÓN.....	13
1. Revisión histórica.....	15
2. <i>Besnoitia besnoiti</i>	18
2.1. Taxonomía	18
2.2. Ciclo biológico y morfología	22
2.3. Transmisión	25
3. La besnoitiosis bovina.....	28
3.1. Distribución geográfica	29
3.2. Prevalencia e incidencia	32
3.3. Factores de riesgo y claves de su re-emergencia	38
3.4. Patogenia, signos clínicos y lesiones	40
3.4.1. Fase aguda.....	40
3.4.2 Fase crónica.....	42
3.5. Diagnóstico y control.....	44
3.5.1. Diagnóstico	44
3.5.1.1. Diagnóstico epidemiológico	45
3.5.1.2. Diagnóstico clínico.....	45
3.5.1.3. Diagnóstico laboratorial	45
3.5.1.3.1. Directo.....	45
3.5.1.3.2. Indirecto	46
3.5.2. Control.....	48
3.5.2.1. Bioseguridad y biocontención.....	48
3.5.2.2. Inmunoprofilaxis y tratamiento	50
CAPÍTULO III: JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	53
CAPÍTULO IV: RESULTADOS (Publicaciones).....	61

OBJETIVO 1. ESTUDIO DE LA SITUACIÓN ACTUAL DE LA BESNOITIOSIS BOVINA EN ESPAÑA EN ZONAS DONDE LA ENFERMEDAD ES ENDÉMICA.....	63
Sub-objetivo 1.1. Prevalencia de la infección por <i>Besnoitia besnoiti</i> en ganado bovino de carne de los Pirineos.....	65
ABSTRACT	67
Sub-objetivo 1.2. Dinámica de la infección por <i>Besnoitia besnoiti</i> en granjas donde la enfermedad es endémica.	73
Summary.....	75
1. Introduction.....	76
2. Material and methods	77
2.1. Experimental design, sampling and data	77
2.2. Serology	78
2.3. Parasitemia detection	79
2.4. Data analysis	80
3. Results	80
3.1. Prevalence	80
3.2. Incidence	82
3.3. Parasitemia	83
4. Discussion	84
OBJETIVO 2. ESTUDIO DE LA INFECCIÓN POR <i>BESNOITIA</i> SPP. EN OTRAS ESPECIES DE RUMIANTES QUE PUEDEN ACTUAR COMO RESERVORIOS U HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS DE <i>B. BESNOITI</i>	91
Sub-objetivo 2.1. Adaptación de técnicas serológicas para el diagnóstico de la besnoitiosis en rumiantes silvestres	93
Abstract.....	95
1. Introduction.....	96
2. Material and methods	97
2.1. Serum samples	97
2.2. Parasite production for serological procedures	98
2.3. Rabbit hyperimmune sera.....	98
2.4. IFAT.....	99

2.5. SDS-PAGE and Western blot	99
2.6. Data analysis	100
3. Results	100
3.1. Test agreement (κ -statistics)	100
3.2. IFAT for infection with <i>B. besnoiti</i> and <i>B. tarandi</i>	100
3.3. Western blot for antigens of <i>B. besnoiti</i> and <i>B. tarandi</i>	101
3.4. Identification of <i>B. besnoiti</i> and <i>B. tarandi</i> antigens in hyperimmune rabbit sera.....	101
3.5. <i>N. caninum</i> and <i>T. gondii</i> infections	102
4. Discussion.....	102
Sub-objetivo 2.2. Primer estudio serológico de la infección por <i>Besnoitia</i> spp. en rumiantes silvestres de Europa.	109
Abstract	111
1. Introduction	112
2. Material and methods.....	113
2.1. Serum samples and experimental design	113
2.2. Cell culture and antigen purification	113
2.3. ELISA	114
2.4. SDS-PAGE and Western blot	115
3. Results	116
3.1. ELISA	116
3.2. Western blot	117
4. Discussion.....	118
Sub-objetivo 2.3. Estudio de la infección por <i>Besnoitia</i> spp. y detección del parásito en zonas donde la besnoitiosis bovina está presente.	123
Abstract	125
1. Introduction	126
2. Material and methods.....	127
2.1. Sampled areas.....	127
2.2. Samples from wild ruminants	128
2.3. Parasites and cell culture	129
2.4. Serology	129
2.5. DNA extraction and ITS-1 PCR	129

2.6. Microsatellite genotyping	130
3. Results	132
3.1. Serology	132
3.2. Tissue samples and ITS-1 PCR	133
3.3. Microsatellite analysis	133
4. Discussion	134
Sub-objetivo 2.4. Descripción de un caso de besnoitiosis sistémica en un corzo (<i>Capreolus capreolus</i>)	139
Summary.....	141
Sub-objetivo 2.5. Primer estudio de la infección por <i>Besnoitia</i> spp. en pequeños rumiantes domésticos de España.....	155
Abstract.....	157
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN GENERAL	163
CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES /CONCLUSIONS.....	179
CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA.....	187

INDICE DE ABREVIATURAS

μl	microlitro (microliter)
μm	micrómetro (micrometer)
2-D	dos dimensiones (two dimensions)
ADN/DNA	ácido dexoxirribonucleico (deoxyribonucleic acid)
ARN/RNA	ácido ribonucleico (ribonucleic acid)
bp	pares de bases (pair bases)
CFIA:	centro de seguridad alimentaria y parasitología animal (centre for food-borne and animal parasitology)
CDS	región codificante (coding sequence)
CI	intervalo de confianza (confidence interval)
DIGE	electroforesis diferencial en gel (differential gel electrophoresis)
DMEM	medio eagle modificado de dulbecco (dulbecco's modified eagle medium)
DMSO	dimetil sulfóxido
DO/OD	densidad óptica (optical density)
dpi	días post-infección
EE.UU.	Estados Unidos de Norte América
EFSA	Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Agency)
ELISA	ensayo inmunoenzimático (enzyme linked immunosorbent assay)
ETs/ESTs	etiquetas de expresión (expressed sequence tags)
FITC	isotiocianato de fluoresceína (fluorescein isothiocyanate)
HD/DH	hospedador definitivo (definitive host)
HE	hematoloxilina-Eosina
HI/IH	hospedador intermediario (intermediate host)
h	horas (hours)
HP	prevalencia de rebaño (herd prevalence)
IDA	antígeno inmunodominante (immunodominant antigen)
IFI/IFAT	inmunofluorescencia indirecta (indirect immunofluorescence)
IgG	inmunoglobulina G
IRPC/RIPC	índice relativo por cien (relative index per cent)
ITS	espacio de transcripción interna (internal transcribed spacer)
kDa	kilodalton
MAGRAMA	Ministerio de Agricultura y Medio Ambiente
MAT	prueba de aglutinación modificada (modified agglutination test)
mg	miligramo (milligram)
min	minutos (minutes)
ml	mililitro (milliliter)
mM	milimolar
MS	secuencia microsatélite (microsatellite sequence)
ND	no determinado (not determined)
nm	nanómetro (nanometer)
np	posición del nucleótido (nucleotide position)
PAC/CAP	política agraria común (common agricultural policy)
PACA	Provenza-Alpes-Costa Azul
PAGE	electroforesis en gel de acrilamida (polyacrilamide gel electrophoresis)
PBS	tampón fosfato salino (phosphate-buffered saline)

PCR	reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)
PDI	proteína disulfuro isomerasa (protein disulfure isomerase)
SCC	quistes tisulares en conjuntiva ocular (scleral conjunctiva cysts)
Se	sensibilidad (sensitivity)
SFB/FBS	suero fetal bovino (fetal bovine serum)
SITRAN	sistema integrado de trazabilidad animal
SNC/CNS	sistema nervioso central (central nervous system)
Sp/Esp	especificidad (specificity)
spi	semana post-infección
SPSS	programa estadístico para ciencias sociales (statistical package for the social sciences)
TAP	prevalencia individual verdadera (true animal prevalence)
TBS	tampón tris salino (tris-buffered saline)
VV	vestíbulo vaginal (<i>vestibulum vaginae</i>)

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1:	21
Otras especies de <i>Besnoitia</i> spp. que afectan a ungulados	
Cuadro 2:	39
Situación del vacuno de carne en España	
Cuadro 3:	41
El semental	

ÍNDICE DE TABLAS

Capítulo II. INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Especies del género <i>Besnoitia</i>	20
Tabla 2. Prevalencia de la besnoitiosis bovina en África y Asia.....	36
Tabla 3. Prevalencia de la besnoitiosis bovina en Europa.....	37

Capítulo III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Capítulo IV. RESULTADOS (Publicaciones)

Objetivo 1. Estudio de la diseminación y situación actual de la besnoitiosis bovina endémica en España

Sub-objetivo 1.1. Prevalence of *Besnoitia besnoiti* infection in beef cattle from the Spanish Pyrenees

Sub-objetivo 1.2. Clinical and serological dynamics of *Besnoitia besnoiti* infection in three endemically infected herds

Table 1. Prevalence of <i>Besnoitia besnoiti</i> infection (95% CI).....	79
Table 2. Incidence of <i>Besnoitia besnoiti</i> infection (95% CI).....	83

Objetivo 2. Estudio de la infección por *Besnoitia* spp. en otras especies de ruminantes que pueden actuar como reservorios u hospedadores intermediarios de *B. besnoiti*

Sub-objetivo 2.1. Serological evidence of *Besnoitia* spp. infection in Canadian wild ruminants and strong cross-reaction between *Besnoitia besnoiti* and *Besnoitia tarandi*

Table 1. Test agreement <i>k</i> -values (95% CI).....	100
Table 2. <i>B. besnoiti</i> , <i>B. tarandi</i> , <i>N. caninum</i> and <i>T. gondii</i> antibody prevalence in ruminants by IFAT.....	101
Table 3. <i>B. besnoiti</i> and <i>B. tarandi</i> IFAT antibody titer distribution in cattle, caribou, muskox and bison.....	102

Sub-objetivo 2.2. First serosurvey of *Besnoitia* spp. infection in European wild ruminants

Table 1. Sex and age data of sampled wild ruminants.....	114
Table 2. Detection of anti- <i>Besnoitia</i> spp. specific antibodies by different serological tools in sera from wild ruminants.....	115

Sub-objetivo 2.3. The role of wild ruminants as reservoirs of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle

Table 1. Genotyping of the different <i>Besnoitia</i> species and <i>Besnoitia besnoiti</i> isolates according to the number of repeat motifs in 6 microsatellite loci.....	131
Table 2. Primers employed in microsatellite analysis.....	132
Table 3. Detection of anti- <i>Besnoitia</i> spp. specific antibodies in sera from wild ruminants.....	133

Sub-objetivo 2.4. Systemic besnoitiosis in a juvenile roe deer *Capreolus capreolus*

Table 1. Lesions and parasite distribution in tissues.....	143
Supplementary table. Genotyping of <i>Besnoitia</i> spp. from roe deer according to the number of repeat motifs in 6 microsatellite loci.....	149

Sub-objetivo 2.5. Absence of serological evidence for *Besnoitia* spp. infection in small domestic ruminants

Table 1. Detection of anti- <i>Besnoitia</i> spp. specific antibodies in sera from small domestic ruminants.....	159
--	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo II. INTRODUCCIÓN

Figura 1. Revisión histórica de la besnoitiosis bovina.....	16
Figura 2. Signos clínicos compatibles con la fase crónica de la infección por <i>Besnoitia</i> spp. en ungulados.....	21
Figura 3. Ciclo biológico y transmisión de <i>B. besnoiti</i>	23
Figura 4. Zoíto de <i>B. besnoiti</i>	24
Figura 5. Quistes tisulares de <i>B. besnoiti</i>	25
Figura 6. Distribución geográfica de la besnoitiosis bovina.....	31
Figura 7. Signos clínicos asociados a la infección por <i>B. besnoiti</i>	43
Figura 8. Diagnóstico y control de la besnoitiosis bovina.....	44
Figura 9. Patrón de reconocimiento de antígenos de taquizoíto de <i>B. besnoiti</i> mediante Western blot en condiciones no reductoras.....	48

Capítulo III. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Capítulo IV. RESULTADOS (Publicaciones)

Objetivo 1. Estudio de la situación actual de la besnoitiosis bovina en España en zonas donde la enfermedad es endémica

Sub-objetivo 1.1. Prevalence of *Besnoitia besnoiti* infection in beef cattle from the Spanish Pyrenees

Figure 1. Origin of tested sera.....	69
Figure 2. Specific antibody levels distribution of seropositive animals.....	70
Figure 3. Age distribution of seropositive animals.....	71

Sub-objetivo 1.2. Clinical and serological dynamics of *Besnoitia besnoiti* infection in three endemically infected herds

Figure 1. Detection of <i>Besnoitia besnoiti</i> tissue cysts.....	81
Figure 2. Western blot analysis of ELISA positive and negative samples.....	82
Figure S1. Serological and clinical dynamics of <i>Besnoitia besnoiti</i> infection.....	89

Objetivo 2. Estudio de la infección por *Besnoitia* en otras especies de rumiantes que pueden actuar como reservorios u hospedadores intermediarios de *B. besnoiti*

Sub-objetivo 2.1. Serological evidence of *Besnoitia* spp. infection in Canadian wild ruminants and strong cross-reactions between *Besnoitia besnoiti* and *Besnoitia tarandi*

Figure 1. Recongnition of <i>B. besnoiti</i> and <i>B. tarandi</i> tachyzoites antigens by caribou sera by Western blot.....	104
Figure 2. Recognition of <i>B. besnoiti</i> and <i>B. tarandi</i> tachyzoite antigens by cattle sera by Western blot.....	105

Figure 3. Homologous and heterologous antigen recognition of <i>B. besnoiti</i> and <i>B. tarandi</i> by sera from rabbits immunized with tachyzoites of these species.....	105
---	-----

Sub-objetivo 2.2. First serosurvey of *Besnoitia* spp. infection in European wild ruminants

Figure 1. Origin of sera from wild ruminants.....	116
Figure 2. TG-ROC analysis of ELISA developed for Cervidae samples using Western blot results as the gold standard.....	117
Figure 3. Western blot analysis of ELISA-positive Cervidae samples.....	118

Sub-objetivo 2.3. The role of wild ruminants as reservoirs of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle

Figure 1. Geographical distribution of wild ruminants sampled in Spain.....	128
---	-----

Sub-objetivo 2.4. Systemic besnoitiosis in a juvenile roe deer *Capreolus capreolus*

Figure 1. Macroscopic lesions. (A) Pinhead-like structures in the ocular conjunctiva and (B) nasal turbinates (yellow arrows). Histochemistry (H-E). <i>Besnoitia</i> spp. cysts in (C) turbinate mucosa and (D) cortex brain with multinucleate and inflammatory cells. Immunohistochemistry labeling of <i>Besnoitia</i> spp. in tissue cysts from (E) brain thalamus and (F) subcutaneous lymph node.....	145
Supplementary figure. Clustal analysis of <i>BbPDI</i>	150

Sub-objetivo 2.5. Absence of serological evidence for *Besnoitia* spp. infection in small domestic ruminants

CAPÍTULO I: RESUMEN / SUMMARY



RESUMEN

La besnoitiosis bovina es una enfermedad crónica y debilitante producida por el protozoo apicomplejo formador de quistes *Besnoitia besnoiti*. Puede llegar a ocasionar importantes pérdidas económicas, ya que afecta negativamente a los parámetros productivos y reproductivos ocasionando aborto, esterilidad en el macho, deterioro de la condición corporal y descenso de la producción lechera. Desde el año 2010 está considerada como una enfermedad re-emergente en Europa, ya que se ha observado un aumento del número de casos y una notable expansión de la enfermedad no solo en España sino también en otros países europeos. En España, hay dos zonas donde la enfermedad ha sido tradicionalmente endémica (los Pirineos y la Sierra de Urbasa-Andía), aunque en la actualidad, la enfermedad está extendiéndose por la mitad norte peninsular así como por el centro y suroeste del país. Las medidas de manejo que habitualmente se realizan en las explotaciones de ganado bovino en extensivo (monta natural y el uso de pastos comunales) son prácticas de riesgo para la transmisión del parásito. Sin embargo, las claves de dicha re-emergencia no se conocen con exactitud, aunque podría haber influido el aumento del censo de ganado bovino de carne gracias a las ayudas de la Política Agraria Común (PAC) y el creciente comercio de animales, sobre todo de sementales, sin control sanitario previo. Este hecho, posiblemente, sea la causa de la aparición de varios brotes epidémicos de la enfermedad en diversos países de Europa Central tras la introducción de animales subclínicamente infectados (portadores asintomáticos). Desafortunadamente, hoy en día se desconocen muchos aspectos epidemiológicos de esta parasitosis que dificultan el control de la enfermedad, a lo que se añade la ausencia de tratamientos y vacunas eficaces. Por ello, la EFSA (European Food Safety Agency) recomendó realizar estudios epidemiológicos en áreas de Europa donde la enfermedad es endémica con el fin de determinar la importancia real de la enfermedad en el ganado bovino y esclarecer, entre otros, el papel que puedan jugar los rumiantes silvestres como posibles reservorios del parásito.

Siguiendo dichas recomendaciones, en la presente Tesis Doctoral se definieron dos objetivos específicos para profundizar en el conocimiento de la epidemiología de la besnoitiosis bovina en España.

En el primer objetivo se estudió la situación actual de la enfermedad en el ganado bovino de carne procedente de zonas donde la besnoitiosis se considerada endémica mediante la realización de estudios de prevalencia y dinámica de la infección o enfermedad en el Pirineo Central y en la Sierra de Urbasa-Andía (Navarra), respectivamente. Los resultados obtenidos han puesto de manifiesto la elevada diseminación de la besnoitiosis bovina en los Pirineos, donde el 87,3% de las granjas estaban infectadas con una seroprevalencia intra-rebaño que osciló entre el 15,1% y el 95,7%, mientras que la seroprevalencia individual fue del 50% tanto en machos como en hembras. En la Sierra de Urbasa-Andía, las tasas anuales de incidencia clínica y serológica fueron del 20% y

del 15%, respectivamente, a pesar de que aproximadamente más del 50% del efectivo estaba infectado. Sin embargo, los signos clínicos observados fueron leves y difícilmente detectables (quistes tisulares en la conjuntiva ocular o el vestíbulo vaginal). Este hecho puede explicarse por el elevado número de animales con infección subclínica presentes en las granjas y la existencia de premunición en las mismas. Por tanto, ambos estudios ponen de manifiesto que cuando la enfermedad es endémica en una zona, si no se establecen las medidas de control adecuadas, los valores de prevalencia e incidencia se mantienen elevados a lo largo del tiempo. Por ello, una herramienta indispensable dentro de las medidas de control de bioseguridad y biocontención es un diagnóstico preciso que combine una inspección clínica exhaustiva con un diagnóstico serológico sensible y específico mediante Western blot. De hecho, se ha detectado un porcentaje de animales con signos clínicos compatibles con la enfermedad y seronegativos mediante Western blot mayor del esperado, posiblemente por la detección de quistes tisulares en el vestíbulo vaginal durante la inspección clínica, una localización no estudiada hasta el momento. Además, se deberán evitar, en la medida de lo posible, aquellos factores de riesgo estrechamente relacionados con las medidas de manejo que favorecen la transmisión y la diseminación de la enfermedad. En este escenario, se recomienda incluir a la besnoitiosis bovina en el programa sanitario de las explotaciones de vaca nodriza, no solo en las zonas donde la enfermedad es endémica sino también en aquellas consideradas como libres. De hecho, la besnoitiosis bovina debería ser estudiada en el ganado bovino en extensivo de otras regiones europeas. Para ello, se recomienda el empleo de un diseño experimental y un protocolo diagnóstico similares a los empleados en la presente Tesis Doctoral que permitan detectar nuevos focos de la infección y hacer comparables los resultados de estudios futuros. Por otra parte, cuando la enfermedad es endémica en una granja existe también el riesgo de infertilidad o esterilidad en los machos recién introducidos y procedentes de zonas libres, ya que según los datos de incidencia obtenidos en este estudio, éstos podrían contraer la enfermedad transcurrido un corto periodo de tiempo. Por todo ello, es necesario cuantificar las pérdidas económicas asociadas a esta enfermedad para poder diseñar e implantar un adecuado programa de control.

En el segundo objetivo se estudió la infección por *Besnoitia* spp. en otras especies de rumiantes relevantes en nuestro país, tanto silvestres como domésticas, que se encuentran en estrecho contacto con el ganado bovino en extensivo y que podrían actuar como posibles hospedadores intermediarios o reservorios del parásito y, por tanto, facilitar el mantenimiento y la transmisión de la enfermedad en el ganado bovino. Se muestrearon 6 de las 7 especies de rumiantes silvestres ampliamente distribuidas por España, cuya población se encuentra en aumento desde mediados del siglo XX. Además, se muestrearon ovejas y cabras, ya que España ocupa el segundo lugar en la Unión Europea (UE) en cuanto al censo de ambas especies. No existen datos acerca de la diseminación de la infección por *Besnoitia* spp. en Europa en ninguna

especie rumiante distinta del ganado bovino. No obstante, la besnoitiosis en rumiantes silvestres ha sido descrita en diferentes especies de cérvidos (reno, caribú y ciervo mula) del norte de Europa (Rusia, Finlandia y Suecia), Alaska y Canadá. Por el contrario, la besnoitiosis caprina se ha descrito, únicamente, en Kenia, Irán y Nigeria, mientras que, hasta el momento, no se ha descrito ningún caso de infección natural en el ganado ovino. Para llevar a cabo este objetivo, inicialmente, se adaptaron las técnicas serológicas (IFI, ELISA y Western blot) empleadas en el ganado bovino para especies pertenecientes a la Familia y Subfamilia Cervidae y Caprinae, respectivamente. Para ello, se comprobó la reacción cruzada existente entre las especies *B. besnoiti* y *B. tarandi*, las cuales afectan al ganado bovino y a los rumiantes silvestres, respectivamente. Ambas especies presentaron un patrón de reconocimiento homólogo y heterólogo idéntico de antígenos del taquizoíto mediante Western blot y los títulos obtenidos mediante IFI difirieron en tan sólo una dilución cuando se emplearon taquizoítos de *B. besnoiti* y *B. tarandi* con sueros homólogos y heterólogos. Por tanto, es posible emplear taquizoítos de *B. besnoiti* como antígeno en las diferentes técnicas serológicas para el diagnóstico de la besnoitiosis en otras especies de ungulados.

A continuación, se llevaron a cabo 2 estudios en rumiantes silvestres siguiendo un protocolo diagnóstico similar al descrito para la besnoitiosis bovina. En primer lugar, se empleó la prueba ELISA como técnica inicial de cribado serológico y, posteriormente, el Western blot como técnica confirmatoria. En el primer estudio se analizaron sueros de corzo, ciervo, rebeco y muflón ($n=1048$) procedentes de diferentes zonas de España donde conviven los rumiantes silvestres con el ganado bovino, confirmándose la infección mediante Western blot, únicamente, en un corzo y en un ciervo del Pirineo. En un segundo estudio, se incrementó el número de animales muestreados ($n=2608$) y se amplió el número de especies muestreadas, incluyéndose el gamo y la cabra montesa. Los animales procedían exclusivamente de zonas donde la besnoitiosis bovina estaba presente, ya fuera en forma endémica (noreste) o en forma de brotes (suroeste). Nuevamente, sólo un corzo y un ciervo fueron seropositivos, los cuales se localizaron también en el Pirineo. La escasa prevalencia de la infección por *Besnoitia* spp. obtenida en ambos estudios ($<0,2\%$) sugiere que estas especies juegan un papel poco relevante en la transmisión de la enfermedad al ganado bovino y, por lo tanto, no pueden considerarse buenos centinelas de la infección. A pesar de los bajos valores de seroprevalencia obtenidos, se confirmó la presencia del parásito en un ciervo y un corzo del Pirineo Central (Aragón) y del Sistema Ibérico (El Maestrazgo de Teruel), respectivamente. Puesto que la besnoitiosis en rumiantes silvestres siempre se ha atribuido a *B. tarandi*, se llevó a cabo el genotipado de los aislados mediante dos abordajes complementarios con el fin de esclarecer qué especie de *Besnoitia* spp. circula entre los rumiantes silvestres en España. En primer lugar, se analizaron 6 secuencias microsatélites de los aislados detectados en el ciervo y en el corzo y, en segundo lugar, se secuenció el gen que codifica la

proteína disulfuro-isomerasa (BbPDI) en el aislado de corzo. Los resultados indican que ambas especies podrían actuar como hospedadores intermediarios de *B. besnoiti*. Sin embargo, apenas se detectó variabilidad genética entre los 11 genotipos de *B. besnoiti* analizados, ya que solo el genotipo italiano fue diferente en uno de los 6 microsatélites estudiados. Estos resultados podrían explicarse por el posible origen común de los aislados analizados, ya que procedían tanto de zonas donde la enfermedad es endémica (el Pirineo francés, la región del Alentejo e Israel) como de zonas donde han tenido lugar algunos de los brotes epidémicos descritos tras la introducción de animales procedentes de las primeras. Por lo tanto, son necesarios nuevos marcadores moleculares con el fin de estudiar más en profundidad la posible variabilidad genética existente en el género *Besnoitia*.

Además, para completar los estudios realizados en rumiantes silvestres, se estudió en profundidad un caso de besnoitiosis sistémica en un corzo macho de 6 a 8 meses de edad. Tanto las lesiones encontradas (alopecia e hiperqueratosis en cabeza y extremidades) como la distribución intra-orgánica del parásito fueron similares a las descritas en otros ungulados (p. ej. ganado bovino, renos, caribúes, burros y cabras). La elevada carga parasitaria, la amplia localización de los quistes tisulares, su pequeño tamaño ($\leq 200 \mu\text{m}$) y la ausencia de quistes degenerados podrían indicar una rápida progresión de la enfermedad que podría haber contribuido a la muerte del animal. Entre los hallazgos más relevantes destaca la presencia de quistes tisulares en el cerebro, confirmandose por primera vez la capacidad de *B. besnoiti* para formar quistes tisulares en sistema nervioso central, al igual que otros miembros de la Familia Sarcocystidae. Además, la respuesta inmunitaria podría haber limitado el crecimiento de los mismos dado el pequeño tamaño de los mismos ($20\text{-}70 \mu\text{m}$) respecto al resto de localizaciones ($100\text{-}200 \mu\text{m}$).

Finalmente, se llevó a cabo un primer estudio preliminar en pequeños rumiantes domésticos siguiendo un planteamiento similar al realizado en los estudios anteriores. Para ello, se seleccionaron dos zonas geográficas donde la besnoitiosis bovina está presente y el ganado bovino de carne comparte el mismo hábitat que las ovejas y las cabras. Este trabajo, aun presentando varias limitaciones como el escaso número de muestras ($n=829$) y zonas ($n=2$) estudiadas, es el primero que se realiza en ovejas y cabras de Europa y constituye una primera aproximación para futuros estudios epidemiológicos. Puesto que no se detectaron anticuerpos específicos frente a *Besnoitia* en cabras ni en ovejas, parece que, en principio, los pequeños rumiantes domésticos no intervendrían en el ciclo biológico de *B. besnoiti*, si bien estos resultados deberían corroborarse con el estudio de un mayor número de rebaños y animales. Además, sería deseable llevar a cabo otros trabajos similares en regiones de España donde la enfermedad está presente en forma de brotes, como por ejemplo en sistemas de dehesa en Extremadura y Andalucía donde el ganado bovino, ovino, caprino y porcino se mantiene bajo un sistema de explotación extensivo. De igual

forma, el estudio de la enfermedad en otros países del sur de Europa, donde la besnoitiosis bovina ya ha sido declarada resulta de interés para esclarecer si éstas especies podrían intervenir en la epidemiología de la enfermedad, más aún cuando en éstos países se concentran los mayores censos de ganado ovino y caprino (p.ej. Francia e Italia).

Esta Tesis Doctoral supone en su conjunto un avance en el conocimiento de la epidemiología de la besnoitiosis bovina en nuestro país. Se ha confirmado la elevada diseminación de la enfermedad en el ganado bovino de carne en zonas donde ésta es considerada como endémica, así como la escasa relevancia de la enfermedad en los rumiantes silvestres y pequeños rumiantes domésticos, los cuales en principio no suponen un riesgo para la transmisión de la enfermedad al ganado bovino. Adicionalmente, las técnicas de genotipado empleadas han demostrado ser útiles en estudios de epidemiología molecular para investigar qué especies de *Besnoitia* podrían circular en las especies de rumiantes silvestres, demostrándose por primera vez que tanto el ciervo como el corzo pueden actuar como hospedadores intermediarios de *B. besnoiti*.

SUMMARY

Bovine besnoitiosis is a chronic and debilitating disease caused by the cyst-forming apicomplexan parasite *Besnoitia besnoiti*. This disease may be responsible for severe economic losses due to the effect on productive and reproductive parameters since it causes abortion, sterility in males, loss of body condition and decrease in milk production. Since 2010, bovine besnoitiosis has been considered to be a re-emergent disease in Europe due to an increased number of cases and geographical expansion in Spain as well as in other European countries. In our country, the disease has been traditionally endemic in two Northern regions (the Pyrenees and Urbasa-Andía mountains) although at present it is also spreading to Central and Southern Spain. It is believed that traditional management measures of beef cattle herds raised outdoors (natural mating, communal pastures and contact with wild ruminants) favors parasite transmission. However, the clues of this re-emergence are still unclear. Two possible explanations might be a higher census of beef cattle population supported by the common agricultural policy (CAP) and the noticeable increase of animal-trade without health control. In fact, animal trade of sub-clinically infected cattle may have contributed to the occurrence of several disease outbreaks recorded in Central Europe. Unfortunately, many biological and epidemiological aspects of the *B. besnoiti* infection remain unknown and make the control of the disease difficult as well as the absence of efficient treatments and/or vaccines. Thus, the EFSA pointed out the need to investigate the disease in regions where bovine besnoitiosis is endemic in order to determine the real importance of the infection in European cattle and the role of wild ruminants among others as reservoirs. Following these recommendations, two specific objectives have been defined in the present Doctoral Thesis in order to improve the knowledge of the epidemiology of bovine besnoitiosis in Spain.

In the first objective, the present situation of bovine besnoitiosis in beef cattle was studied in those regions where the disease is endemic by conducting prevalence and infection dynamics studies in the Central Pyrenees and Urbasa-Andía mountains (Navarra), respectively. The results have shown that bovine besnoitiosis is highly widespread in the Pyrenees, where the herd prevalence rate was 87.3%, intra-herd prevalence ranged between 15.1% and 95.7% and both sexes were similarly affected (approximately 50%). In Urbasa-Andía Mountains, 20% and 15% clinical and serological incidence rates, respectively, were reported, despite more than 50% of the cattle being infected. Clinical signs were mild and hardly detectable (tissue cysts located in the *vestibulum vaginae* and sclera). This fact can be explained by the high percentage of sub-clinically infected cattle and the existence of premunition. Both studies have proven that the absence of a herd health scheme under a stable endemic situation are conducive to constant high prevalence and incidence rates over time. Respect of bio-safety and bio-containment measures applied for bovine besnoitiosis, an exhaustive clinical inspection coupled with Western blot is needed in order

to avoid false positive and negative results. In fact, detection of a percentage of animals with clinical signs compatible with *B. besnoiti* infection and seronegative by Western blot was higher than expected probably due to the clinical inspection of *vestibulum vaginae*, a location studied for the first time. In addition, risk factors related to the management measures should be avoided since these favor transmission and dissemination of disease.

In this scenario, it is highly recommended to include bovine besnoitiosis in the animal health scheme of beef cattle herds in regions where the disease is endemic as well as in *Besnoitia*-free regions. In fact, bovine besnoitiosis should be further studied in cattle raised under extensive conditions from other European regions. These studies may be useful to detect new outbreaks, by following a similar experimental design and diagnostic protocol in order to make future studies comparable. Additionally, in herds and/or regions, where the disease is endemic, there is a risk of infertility in recently acquired breeding bulls, which are usually traded. According to the high incidence rates naïve breeding bulls might be infected in a short period of time. For this reason, it is imperative to quantify the economic losses associated to bovine besnoitiosis to implement an appropriate control program.

In the second objective, the *Besnoitia* spp. infection was studied in other relevant ruminant species in Spain (wild and domestic), which share the same habitat with cattle raised under extensive conditions. These ruminant species might act as reservoirs or intermediate hosts of *B. besnoiti* and facilitate the maintenance and transmission of the disease to cattle. Six out of 7 wild ruminant species widely distributed in Spain were sampled. These wild ruminant populations have notably increased in size from the mid-20th century to the end of the 20th century. In addition, sheep and goats were also sampled. The importance of these domestic ruminant species relies on the number of animals since Spain accounts for the second highest census of both species in the EU. Remarkably, there is no data about the spread of *Besnoitia* spp. infection in Europe in any ruminant species different from cattle. Nevertheless, besnoitiosis in wild ruminants has been reported in several cervid species of northern Europe, Russia, Alaska and Canada, and caprine besnoitiosis has been recorded in Kenya, Iran and Nigeria. On the contrary, clinical cases of ovine besnoitiosis have not been notified yet.

To carry out this objective, first, serological techniques (IFAT, ELISA and Western blot) employed in cattle were adapted for the diagnosis of besnoitiosis in Cervidae and Caprinae species. For this purpose, cross-reactions between *B. besnoiti* and *B. tarandi* species, which affect bovids and cervids, respectively, were studied. The same homologous as well as heterologous pattern of tachyzoite antigen recognition was detected by sera from cattle and wild ruminants regardless *Besnoitia* species extract used in the tachyzoite-based Western blots. In addition, IFAT titers differed by only one dilution. Thus, these results proved that *B. besnoiti* tachyzoites can be employed in the diagnosis of besnoitiosis in other ungulate species.

Next, two serosurveys in wild ruminants species were performed by following a similar diagnostic protocol for bovine besnoitiosis. All serum samples were first analyzed by ELISA and, subsequently, positive and doubtful results were confirmed by Western blot.

In the first serosurvey roe deer, red deer, chamois and mouflon ($n=1048$) were sampled from different Spanish regions where cattle and wild ruminants share the same habitat. *Besnoitia* spp. infection was confirmed in one roe deer and one red deer from the Pyrenees by Western blot. In the second serosurvey, the sample size was increased ($n=2608$) as well as the wild ruminants species by including fallow deer and Spanish wild goat. Areas where bovine besnoitiosis is traditionally endemic (northeastern) and where new outbreaks have been recently reported (southwestern) were selected for the study. Once again, only one roe deer and one red deer were seropositive and were located in the Pyrenees. Thus, the low prevalence rates found ($<0.2\%$) indicate that wild ruminant species do not pose a risk of transmitting the infection to cattle and are not good sentinels of bovine besnoitiosis.

Despite these low seroprevalence rates, the presence of the parasite was confirmed throughout molecular techniques in one red deer and one roe deer from the Central Pyrenees and Iberian System, respectively. Molecular differences were found between *B. besnoiti*, *B. tarandi* and *B. bennetti*. Due to the fact that besnoitiosis in wild ruminants has been always attributed to *B. tarandi* infection, two different approaches were carried out in order to know which *Besnoitia* species is circulating among Spanish wild ruminants.

First, a partial genotyping was carried out through microsatellite analysis by using DNA of a lymph node of a seropositive red deer and, second, the coding region of *BbPDI* was also sequenced in the DNA sample from nasal turbinate of a seropositive roe deer together with a complete genotyping by using microsatellite analysis. Despite the constraints (autolytic tissues and scarce available molecular tools), the results suggest that both species might act as intermediate hosts of *B. besnoiti* infection. However, a scarce genetic intra-species diversity in *B. besnoiti* was reported in the 11 *B. besnoiti* genotypes analyzed. Exclusively the Italian genotype was different to the remaining in one microsatellite. This limited genetic diversity in *B. besnoiti* may be explained by the origin of the isolates analyzed, which is likely to be the same genotype since the recent outbreaks (e.g. Spain, Germany and Italy) of the disease were due to animal trade from traditionally endemic areas such as the Pyrenees and Alentejo region (Portugal). However, new phylogenetic markers and the sequencing of the genome are needed in order to clarify the genetic variability of *Besnoitia* species/isolates in ungulates.

Moreover, in order to complement the studies carried out in wild ruminants, systemic besnoitiosis in a juvenile roe deer was investigated for the first time. Lesions (alopecia and hyperkeratosis in head and limbs) and intra-organic distribution of the parasite were similar to those reported in others ungulates (e.g. reindeer, caribou, donkeys and goats). The wide intra-

organic distribution and high parasite load together with the small size of tissue cysts (<200 µm) without any surrounding granulomatous response may be indicative of the severity and a rapid progression of the disease, which may have contributed to the death. One of the most relevant findings was the presence of tissue cysts in the brain, which confirm the capacity of *Besnoitia* spp. to form tissue cysts in the central nervous system (CNS). Considering that tissue cyst development is rather synchronous, a feasible explanation might be that immune response could have limited cyst growth (20-70 µm) supported by the inflammatory response found in the brain cortex.

Finally, a first preliminary study was carried out in small domestic ruminants by following a similar experimental design used in previous studies. Sera samples were first analyzed by an *in-house* ELISA and positive results were confirmed a posteriori using a tachyzoite-based Western blot. Two geographical areas where bovine besnoitiosis is present and beef cattle share the same habitat as sheep and goats were selected. Despite the limitations of this work, such as the scarce number of regions ($n=2$) and animals ($n=829$) sampled, this is the first serosurvey carried out in small domestic ruminants in Europe and constitutes a first approach for future studies.

The absence of specific antibodies against *Besnoitia* spp. infection in goats and sheep suggest that both species are not involved in *Besnoitia* spp. life cycle in Spain. However, these results need to be corroborated by sampling a higher number of herds and animals. In addition, further studies conducted in extensive semi-natural sylvopastoral woodlands known as "dehesas" dehesas and Mediterranean forests (e.g. Extremadura and Andalucía) where a mixture of different livestock species (beef cattle, sheep, goats and Iberian pigs) share habitat with several wild animal species are also recommended. Similarly, given the re-emergence of the cattle disease in Europe, further studies in sheep and goats from other Southern European countries (e.g. France and Italy) with high census of sheep and goats are needed in order to know the role of these ruminant species in the epidemiology of bovine besnoitiosis.

In summary, this Doctoral Thesis has notably contributed to the knowledge of the epidemiology of bovine besnoitiosis in Spain. A high spread of the disease in beef cattle herds has been confirmed in those regions where the disease is endemic. Additionally, the results also suggest a limited relevance of wild ruminants and small domestic ruminants in the transmission of *B. besnoiti* to cattle. Molecular techniques were proven to be helpful in epidemiological studies to investigate the *Besnoitia* species circulating in ungulates. Lastly, it has been shown for the first time that red deer and roe deer can act as intermediate hosts of *B. besnoiti*.

CAPÍTULO II: INTRODUCCIÓN



1. Revisión histórica

La besnoitiosis bovina es una enfermedad parasitaria de curso crónico y debilitante ocasionada por el protozoo apicomplejo *Besnoitia besnoiti*. La enfermedad se denominaba antiguamente sarcosporidiosis cutánea, globidiosis o elefantiasis, producida por el agente *Globidium besnoiti* o *Sarcocystis besnoiti* (Cuillé et al., 1936; Pols, 1954). Posteriormente, el agente etiológico se encuadró dentro de un nuevo género denominado *Besnoitia*, denominándose definitivamente *B. besnoiti*, en honor a Besnoit, uno de sus descubridores (Jellison, 1956).

Las primeras descripciones clínicas de la enfermedad datan de finales del siglo XIX y principios del siglo XX en el sur de Francia (los Pirineos) y Portugal (región del Alentejo) (Cadéac, 1884; Besnoit y Robin, 1912; Franco y Borges, 1915). En las mismas, no sólo se describieron detalladamente las lesiones cutáneas compatibles con la enfermedad (escleroderma, hiperqueratosis y alopecia), sino que también se detectó microscópicamente al agente etiológico mediante la visualización de quistes tisulares en el tejido conjuntivo subcutáneo.

La primera descripción de la enfermedad en el continente africano se llevó a cabo en Sudáfrica a mediados del siglo XX (Hofmeyr, 1945). Se piensa que la llegada de la enfermedad al país pudo deberse a la

introducción de animales infectados procedentes de las tribus nómadas bantúes y hotentotes a partir del siglo XV (Bigalke, 1968). Desde 1945, la enfermedad fue diagnosticada en la mayor parte de los países subsaharianos (Bigalke, 1981).

En Asia, la primera descripción de la enfermedad tuvo lugar en Corea del Sur (Fukushima e Issiki, 1932; citado por Lee et al., 1970), aunque fue en Israel, donde se llevaron a cabo con posterioridad la mayor parte de los estudios (Neuman, 1962a,b; Shkap, 1986). No obstante, la enfermedad también fue descrita en Asia Central y Oriental, concretamente en Kazajistán y China (Krasov, 1975; Shaowen et al., 1981).

Desde los años 50 hasta los 80 la besnoitiosis bovina cobró especial importancia en Sudáfrica e Israel (Fig. 1), donde las producciones ganaderas se vieron mermadas en aquellas explotaciones o regiones donde la enfermedad estaba presente (Pols, 1960). En los últimos años, la enfermedad se ha seguido notificando en varios países africanos (p.ej. Sudáfrica y Nigeria), lo cual indica que sigue aún presente en éstas zonas (Dubey et al., 2013; Sambo et al., 2014). De hecho, en Zimbabue se ha incluido a la besnoitiosis bovina entre las principales causas que afectan a la producción del ganado bovino (Chatikobo et al., 2013).

Debido a la importancia de la besnoitiosis bovina en Sudáfrica e Israel, fue en éstos países donde se llevaron a cabo

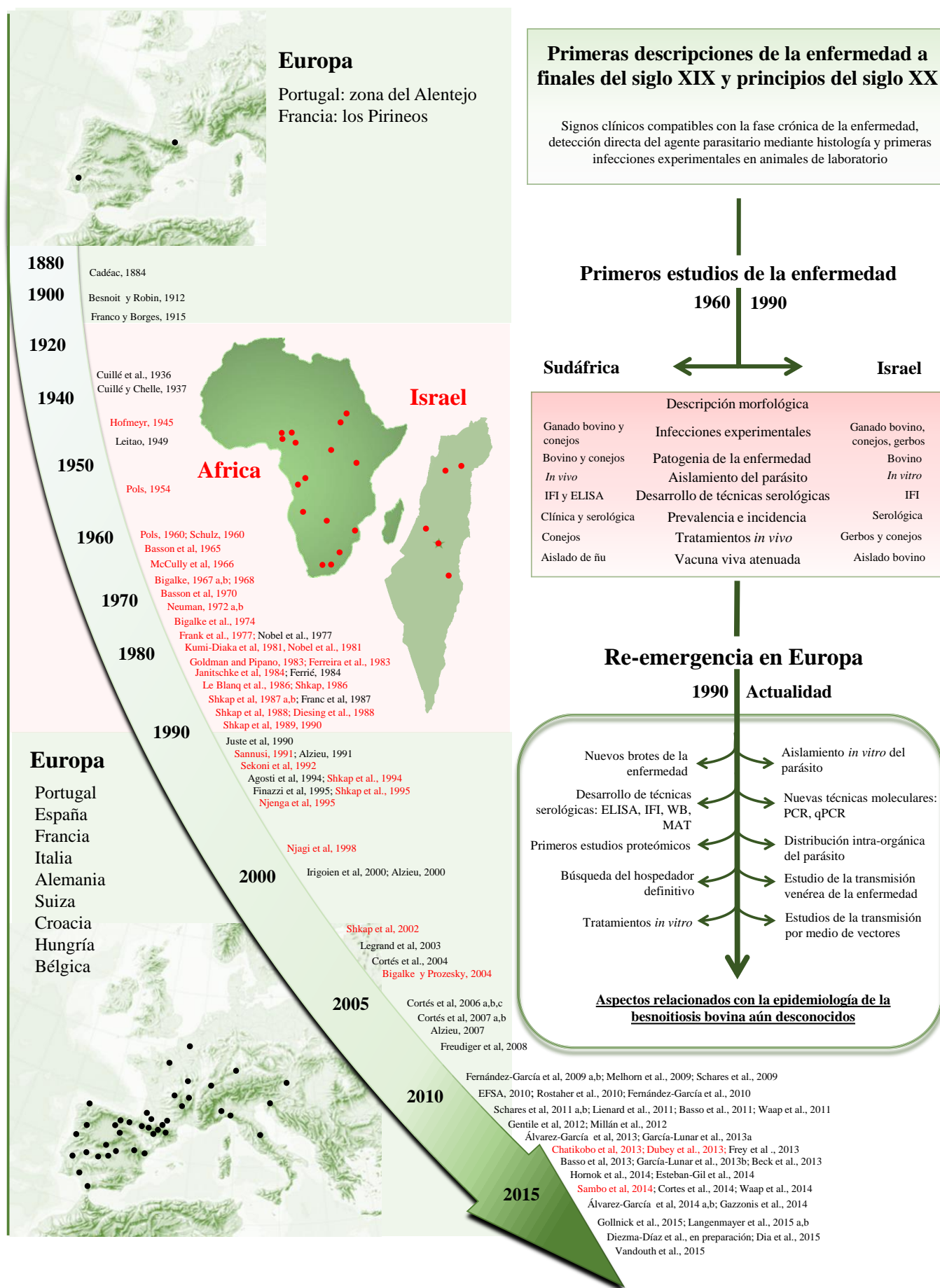


Figura 1: Revisión histórica de la besnoitiosis bovina

los primeros estudios de la enfermedad: (i) describieron las principales características morfológicas de los estadios parasitarios en el hospedador intermediario (Pols, 1960); (ii) lograron con éxito la transmisión de la enfermedad de animales enfermos a sanos y fueron capaces de propagar el parásito *in vivo* mediante infecciones experimentales en conejo (Bigalke, 1968); (iii) mediante infecciones experimentales, describieron la patogenia de la enfermedad y los signos clínicos en el bovino, así como su distribución intra-orgánica tanto en machos como en hembras (Pols, 1960; McCully et al., 1966; Kumi-Diaka et al., 1981; Nobel et al., 1981); (iv) en ausencia de fármacos eficaces (Pols, 1960; Shkap et al., 1987b), se desarrolló una vacuna viva inactivada basada en la inoculación por vía subcutánea de taquizoítos procedentes de un aislado atenuado de ñu capaz de proteger frente a los signos clínicos de la enfermedad (Bigalke et al., 1974; Shkap, 1986); por último, (v) se realizaron los primeros estudios de prevalencia e incidencia clínica en Sudáfrica (Bigalke, 1968); asimismo, el desarrollo de técnicas serológicas como la inmunofluorescencia indirecta (IFI) o el ensayo inmunoenzimático (ELISA) permitió llevar a cabo los primeros estudios de seroprevalencia en ganado bovino en Israel y Sudáfrica (Goldman y Pipano, 1983; Janitschke et al., 1984). A pesar de estos logros, la situación se ha estancado desde finales de la década de los 80,

desconociéndose en la actualidad la situación de la enfermedad en ambos países.

Por otra parte, no se han registrado datos de la eficacia de la vacunación en Israel, donde, actualmente, está en uso y se aplica a todos los sementales del país entre los 9 y los 12 meses de edad (Shkap, comunicación personal).

En cuanto a la situación de la enfermedad en Europa, se piensa que la enfermedad llegó, al menos en Portugal, mediante la introducción de animales infectados procedentes de las antiguas colonias portuguesas en África a partir del siglo XV, ya que gran parte de los animales importados a Portugal procedentes de Angola (antigua colonia portuguesa) estaban infectados (Leitao, 1949). Además, la raza más afectada en Sudáfrica es la Afrikaner, originaria de cruces entre el ganado portugués (raza Alentejana) y el ganado hotentote (Bigalke, 1968). Por el contrario, se desconoce el origen de la enfermedad en Francia.

Desde las primeras descripciones realizadas a principios del siglo XX hasta los años 90, existe un gran desconocimiento de la enfermedad en Europa. Probablemente, la besnoitiosis bovina fue confundida con otras enfermedades o pasó desapercibida (Fig. 1), a pesar de que durante ese tiempo fue descrita por veterinarios clínicos franceses (Legrand, 2003). De hecho, según las observaciones de Franc et al. (1987), el número de casos de la enfermedad en Francia comenzó a aumentar entre los años 1975 y 1980 (Franc y

Cardiegues, 1999), aunque no existen datos publicados al respecto.

En el año 2010, la EFSA alertó sobre la re-emergencia de la enfermedad en Europa debido al creciente número de casos en diversos países del centro y sur de Europa (Fig. 1). Actualmente, la presencia de la enfermedad ha sido confirmada en Portugal, España, Francia, Suiza, Alemania, Italia, Croacia, Hungría y, más recientemente, en Bélgica (EFSA, 2010; Basso et al., 2013; Beck et al., 2013; Hornok et al., 2014; Vandhoudt et al., 2015).

Por esta razón, se han multiplicado los estudios en la última década (Fig. 1), desarrollándose con éxito nuevas técnicas de diagnóstico serológicas y moleculares que han permitido describir, de forma más detallada, los nuevos brotes de la enfermedad. Sin embargo, a pesar de todos los logros científicos alcanzados hasta el momento, son muchas las incógnitas que quedan aún por esclarecer, entre ellas: (i) la prevalencia e incidencia de la enfermedad en zonas donde la enfermedad es endémica; (ii) el ciclo biológico, los modos de transmisión y los reservorios del parásito; y (iii) tratamientos y vacunas eficaces.

2. *Besnoitia besnoiti*

2.1. Taxonomía

El agente etiológico responsable de la besnoitiosis bovina es un protozoo

apicomplejo formador de quistes tisulares denominado *B. besnoiti* (Besnoit y Robin, 1912), perteneciente al Phylum Apicomplexa, Familia Sarcocystidae y Subfamilia Toxoplasmatinae, al igual que otros géneros como *Neospora*, *Toxoplasma* y *Hammondia*. El género *Besnoitia* engloba 10 especies que, mayoritariamente, afectan a mamíferos (Tabla 1). La clasificación taxonómica se llevó a cabo siguiendo unos criterios clásicos atendiendo a sus características morfológicas y a sus hospedadores (intermediarios y definitivo) (Honigberg et al., 1964; Tenter et al., 2002). Sin embargo, el desarrollo de la microscopía electrónica y las técnicas moleculares han aportado nuevos criterios a tener en cuenta en su clasificación.

En relación a las características morfológicas y ultraestructurales de *Besnoitia* spp., algunos autores hicieron distinciones en cuanto al número de organelas y estructuras internas del parásito (p.ej. roptrias) (Hilali et al., 1990; N'jenga, 1995), que hoy en día no se consideran relevantes (Langenmayer et al., 2015b). Se considera que no existen diferencias significativas entre las diferentes especies de *Besnoitia*, a excepción de la presencia o ausencia de cuerpos enigmáticos (Mehlhorn et al., 2009) (Tabla 1). En cuanto a los hospedadores, se conoce el hospedador intermediario en las 10 especies de *Besnoitia* descritas hasta el momento, mientras que el hospedador definitivo solo ha sido identificado en 4 de ellas (Olias et al., 2011) (Tabla 1). Atendiendo al hospedador intermediario, las especies del género

Besnoitia se dividen en dos grupos, aquellas que parasitan a pequeños ($n=6$) y a grandes mamíferos ($n=4$). Estas últimas son *B. besnoiti*, *B. tarandi*, *B. bennetti* y *B. caprae*, las cuales producen unos signos clínicos similares en bóvidos, cérvidos, équidos y cabras, respectivamente (Olias et al., 2011) (Cuadro 1; Fig. 2). En el caso del género *Besnoitia*, al realizarse una clasificación taxonómica en función de la especie animal hospedadora se obvia el ciclo biológico heteroxeno en el cual el parásito podría ser eurixeno en el caso del hospedador intermediario. El principal ejemplo a éste respecto es *T. gondii*, capaz de infectar a un amplio espectro de hospedadores intermediarios (Hutchison, 1965).

Con el fin de reproducir la enfermedad en otras especies animales, se han realizado diversas infecciones experimentales con las diferentes especies de *Besnoitia* (Tabla 1). Sin embargo, no existen datos concluyentes acerca del espectro de hospedadores de cada especie porque la mayoría de los estudios se han realizado con *B. besnoiti* y éstos, al emplearse diferentes vías de administración, dosis de infección y estadios del parásito no son comparables entre sí.

Por último, en relación con las características moleculares del género *Besnoitia*, el desconocimiento del genoma dificulta el estudio de las diferencias entre especies o aislados. Las secuencias publicadas de *Besnoitia* se reducen, principalmente, a fragmentos ribosomales (18S, 5.8S y 28S) y a los espacios transcritos internos (ITSs) ITS-1

e ITS-2. Concretamente, la región ITS-1 se considera un excelente marcador genético de especie para estudios filogenéticos en coccidios (Barta, 2001). De hecho, este marcador separa a las especies de *Besnoitia* que afectan a pequeños mamíferos de las que afectan a ungulados, las cuales presentan un 99% de homología entre sí.

Estudiando éstos fragmentos ribosomales en especies de *Besnoitia* que afectan a ungulados, concretamente el ITS-1, Ellis et al. (2000) fueron los primeros en poner en duda que *B. caprae* y *B. besnoiti* sean dos especies diferentes. En este sentido, Namazi et al. (2011) confirmaron la estrecha relación existente entre *B. caprae* y *B. besnoiti* analizando la secuencia ITS-2, que difirió exclusivamente en la posición de un nucleótido. Posteriormente, con la secuenciación de la región ITS-1 se ha demostrado que no existen diferencias entre las 4 especies de *Besnoitia* que afectan a ungulados (Olias et al., 2011).

Recientemente, se ha desarrollado una nueva herramienta basada en el estudio de microsatélites capaz de diferenciar entre *B. besnoiti*, *B. tarandi* y *B. bennetti* e incluso entre diferentes aislados de *B. besnoiti* (Madubata et al., 2012). Por ello, el descubrimiento del hospedador definitivo y el avance en el estudio de diferentes marcadores genéticos, así como la descripción del genoma podrían ayudar a esclarecer la controvertida filogenia de este género (Jacquet et al., 2010).

Tabla 1: Especies del género *Besnoitia*

	<i>B. akodon</i>	<i>B. bennetti</i>	<i>B. besnoiti</i>	<i>B. caprae</i>	<i>B. darlingi</i>	<i>B. jellisoni</i>	<i>B. neotomofelis</i>	<i>B. oryctofelisi</i>	<i>B. tarandi</i>	<i>B. wallacei</i>
Hospedador intermediario	ratón (<i>Akodon montensis</i>)	asno, caballo, cebra	ganado bovino, ñu, kudu, impala	cabra	lagarto y zarigüeya (<i>Ameiva</i> , <i>Basiliscus</i> y <i>Didelphis marsupialis</i>)	rata (<i>Dipodomys</i> spp., <i>Peromyscus maniculatus</i>)	rata (<i>Neotoma micropus</i>)	conejo (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	caribú, reno, ciervo mula, buey almiscelero	rata (<i>Rattus</i>)
Hospedador definitivo	desconocido	desconocido	desconocido	desconocido	gato	desconocido	gato	gato	desconocido	gato
Presencia de cuerpos enigmáticos	SI	NO	NO	NO	SI	SI	SI	SI	NO	SI
Infección experimental	ratón* gerbo*	ND	ganado* bovino* cabra* conejo* oveja* gerbo* hamster* cobaya*	cabra* ratón* pollo*	ratón*	ratón*	ratón*, rata*	ratón* gerbo*	ND	ratón* rata*
Localización geográfica	Brasil	Africa, Francia, EE.UU.	Africa, Asia, Europa, Venezuela	Kenia, Irán, Nigeria	EE.UU., Panamá	EE.UU.	EE.UU.	Argentina	EE.UU., Canadá, Finlandia, Rusia, Suecia	EE.UU. (Hawai), Japón y Kenia
Referencias	Dubey et al., 2003c	Dubey et al., 2005	Pols, 1960; Bigalke, 1968; 1981; Shkap et al., 1987 a,b; Dubey et al., 2003a; Lienard et al., 2015	Heydorn et al., 1984; Nganga y Kasigazi, 1994; Oryan et al., 2014	Smith y Frenkel, 1977; Dubey et al., 2002	Jellison et al., 1956; Senaud et al., 1974	Dubey y Yabsley., 2010	Dubey et al., 2003b,d	Leighton y Gajadhar, 2001; Dubey et al., 2004	Wallace y Frenkel, 1975; Ng'ang'a et al., 1994

*Detección de quistes tisulares en piel y diferentes órganos internos (p. ej. hígado, pulmón, intestino, corazón)

#Signos compatibles con la fase aguda de la enfermedad (p. ej. fiebre)

ND: No determinado

CUADRO 1: Otras especies de *Besnoitia* spp. que afectan a ungulados

Besnoitia tarandi, denominada inicialmente como *Fibrocystis tarandi*, fue descrita a principios del siglo XX, en un caribú de Alaska (EE.UU.) que presentó signos clínicos compatibles con besnoitiosis crónica (Hadwen, 1922). Posteriormente, Levine (1961) denominó a ésta especie como *B. tarandi* y, desde entonces, se han descrito diferentes casos clínicos de besnoitiosis en el reno, el caribú, el ciervo mula y el buey almizclero. *Besnoitia tarandi* ha sido descrita, únicamente, en rumiantes silvestres en regiones árticas y sub-árticas de Europa (Suecia y Finlandia), Asia (Rusia) y el continente americano (Alaska y Canadá), por lo que, hasta el momento, nunca ha compartido localización geográfica con el resto de especies de *Besnoitia* (Leighton y Gajadhar, 2001). No obstante, en nuestro país, la besnoitiosis fue descrita en un corzo procedente del Pirineo (Fernández de Luco et al., 2000), aunque la especie de *Besnoitia* spp. implicada no fue esclarecida. Los escasos estudios realizados se basan en casos aislados de animales muertos o abatidos, o bien en estudios de prevalencia clínica basados en la detección de quistes tisulares en biopsias cutáneas (Lewis, 1989; 1992; Ducrocq et al., 2012). Se piensa que es una enfermedad endémica en el caribú del norte de Canadá, dadas las elevadas tasas de prevalencia clínica descritas cercanas al 50% (Ducrocq et al., 2012). Incluso se ha sugerido que esta enfermedad podría estar afectando al drástico descenso de las poblaciones de esta especie en el ártico (Vors y Boyce, 2009).

Besnoitia bennetti, fue descrita por primera vez en un caballo del norte de Francia por Henry y Masson (1922), quienes denominaron inicialmente a la enfermedad como globidiosis cutánea y al agente responsable *Globidium leuckarti*. Cinco años más tarde Bennet (1927) describió *B. bennetti*, por primera vez, en el continente africano (Sudán). A mediados del siglo XX la enfermedad se diagnosticó en mulas de Asia (Kazajistán) (Zolotareva, 1965; citado por Zasukhin et al., 1973). Desde entonces, varias especies de équidos (el asno, el caballo o la cebra) se vieron afectados (Pols, 1960). En EE.UU., la besnoitiosis equina se describió por primera vez a mediados del siglo XX (Gorlin et al., 1959) y podría considerarse actualmente como una enfermedad re-emergente en asnos dada su actual distribución y diseminación por el país (Ness et al., 2014). Cabe señalar, que la besnoitiosis en équidos también ha sido descrita en el sur de España (Soria-López et al., 2011), aunque la especie de *Besnoitia* spp. implicada no se pudo determinar.

Besnoitia caprae, responsable de la besnoitiosis caprina, fue descrita por primera vez en cabras domésticas de Kenia por Bwangamoi (1967). Años más tarde, esta especie fue detectada tanto en cabras domésticas como silvestres de Irán, Kenia y Nigeria y su localización parece estar restringida a estos países (Oryan et al., 2014).

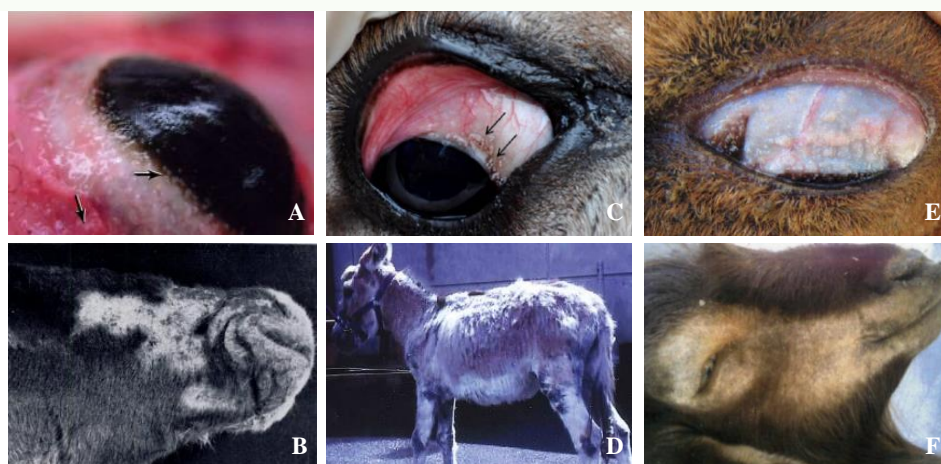


Figura 2. Signos clínicos compatibles con la fase crónica de la infección por *Besnoitia* spp. en ungulados. *Besnoitia tarandi* (A-B) (Wobeser, 1976; Dubey et al., 2004). *Besnoitia bennetti* (C-D) (Dubey et al., 2005; Ness et al., 2014). *Besnoitia caprae* (E-F) (Oryan et al., 2014). Quistes tisulares en la conjuntiva ocular (A-C-E). Hiperqueratosis, alopecia facial y periorbitaria (B-D-F). *Ver apartado 3.4

2.2 Ciclo biológico y morfología

Se desconoce el ciclo biológico completo de *B. besnoiti*, aunque se piensa que es heteroxeno y que los bóvidos (ganado bovino y diversas especies de antílopes) actúan como hospedadores intermediarios (Fig. 3). El hospedador definitivo es desconocido, pero se especula con la posibilidad de que sea el gato (*Felis silvestris catus*) o algún carnívoro silvestre (Diesing et al., 1988; Basso et al., 2011), tal y como ocurre en 4 de las 10 especies de *Besnoitia* descritas actualmente (Tabla 1).

En el ciclo biológico de *B. besnoiti* se han identificado, hasta el momento, dos estadios parasitarios en el hospedador intermediario: el taquizoíta y el bradizoíta localizado en el interior de los quistes tisulares. Ambos son estadios asexuales e intracelulares responsables de las fases aguda y crónica de la enfermedad, respectivamente. Se piensa que en el hospedador definitivo tiene lugar la fase sexual del ciclo biológico tras el consumo de tejidos parasitados con quistes tisulares. El hospedador definitivo, eliminaría al ambiente ooquistes sin esporular con sus heces y que tras la esporulación y su ingestión serían infectantes para el hospedador intermediario. Los ooquistes esporulados, de ser similares a los

descritos para otras especies de *Besnoitia*, tendrían forma esférica o subesférica, medirían 12x12 µm aproximadamente y contendrían en su interior dos esporoquistes con cuatro esporozoítos cada uno (Tadros y Laarman, 1982).

Por último, cabe señalar el posible papel que pueden jugar los rumiantes silvestres y los pequeños rumiantes domésticos que comparten hábitat con el ganado bovino (Fig. 3). Incluso otros animales pertenecientes a las Familias Muridae, Mustelidae, Leporidae, Sciuridae o Talpidae, comprenden especies animales presentes en zonas donde la besnoitiosis es endémica que no deberían descartarse como posibles reservorios u hospedadores intermediarios de la enfermedad. De hecho, recientemente, Hornok et al. (2015a) han sugerido la participación de los murciélagos en el ciclo biológico de *B. besnoiti* al encontrar ADN ribosomal (18S) en una de las 221 muestras de heces analizadas. La especie de murciélago en la que se encontró (*Myotis dasycneme*) está actualmente en peligro de extinción y no se encuentra en nuestro país. No obstante, la presencia de otras especies de murciélagos insectívoros en las granjas de ganado bovino de España es frecuente, por lo que la presencia de *Besnoitia* no debe descartarse.

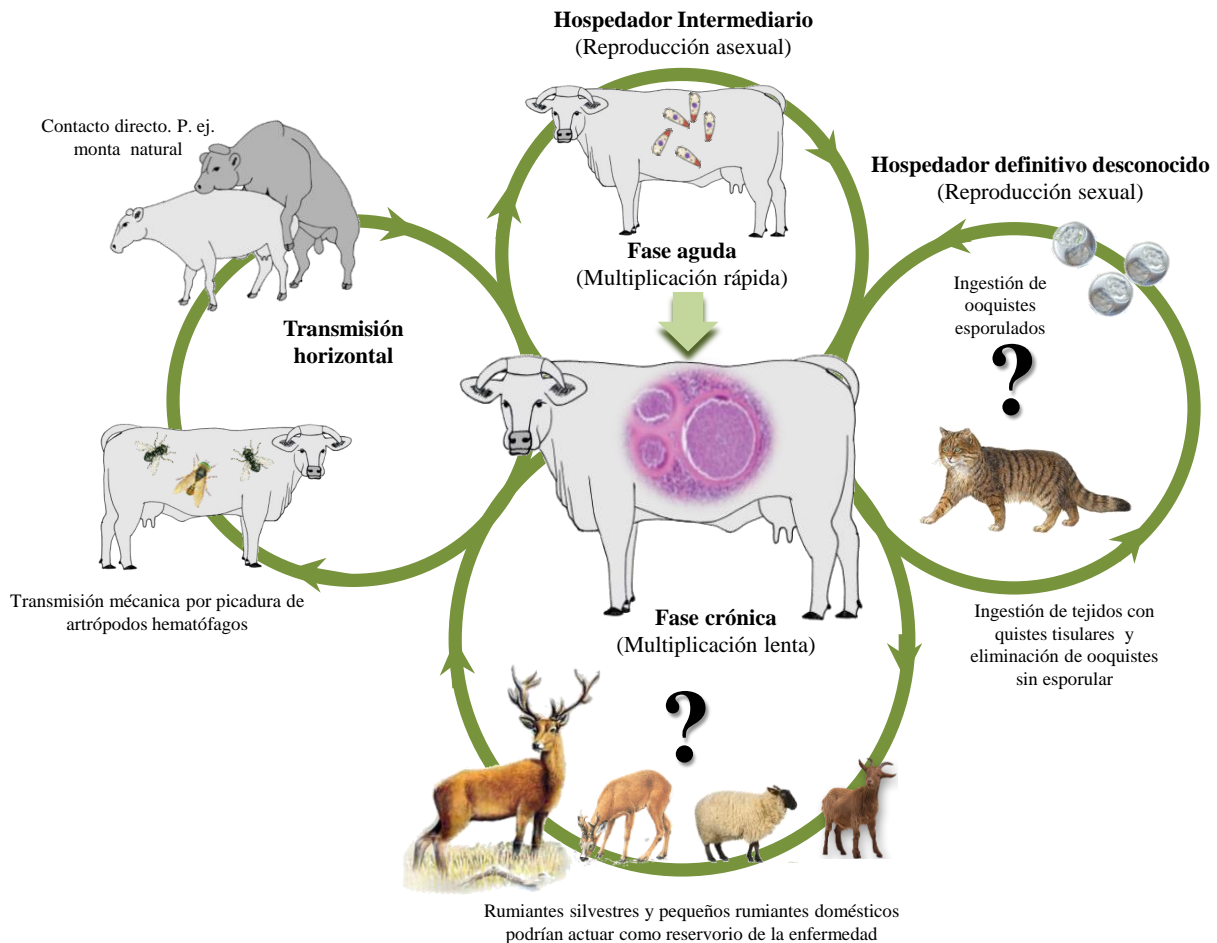


Figura 3: Ciclo biológico y transmisión de *B. besnoiti*.

El taquizoíto y el bradizoíto son morfológicamente muy similares entre sí. Estos zoítos presentan forma de banana y un complejo apical exclusivo de las fases infectantes de los protozoos apicomplejos. En los zoítos se han descrito las siguientes estructuras: dos anillos polares, un conoide, una película integrada por un plasmalema y una membrana interna, microtúbulos subpeliculares, micronemas, roptrias, una mitocondria, un apicoplasto, un núcleo, el aparato de Golgi, ribosomas, gránulos densos, gránulos de amilopectina, cuerpos lipídicos, retículo endoplásmico, un microporo y un poro posterior (Fig. 4) (Langermayer et al., 2015b). Los zoítos de *B.*

besnoiti son de morfología ovoide y su tamaño oscila entre 6-7,5 μm de longitud y 1,9-2,3 μm de anchura. Presentan entre 2 y 8 roptrias y un elevado número de micronemas localizados principalmente en el extremo anterior. El núcleo se encuentra en la mitad posterior y la mitocondria está localizada normalmente anterior al núcleo. Los zoítos presentan pocos gránulos densos y los cuerpos lipídicos y los gránulos de amilopectina se encuentran en mayor cantidad en los bradizoítos de quistes tisulares maduros que en los taquizoítos y en los bradizoítos de quistes tisulares inmaduros (Dubey et al., 2003a; Langenmayer et al., 2015b).

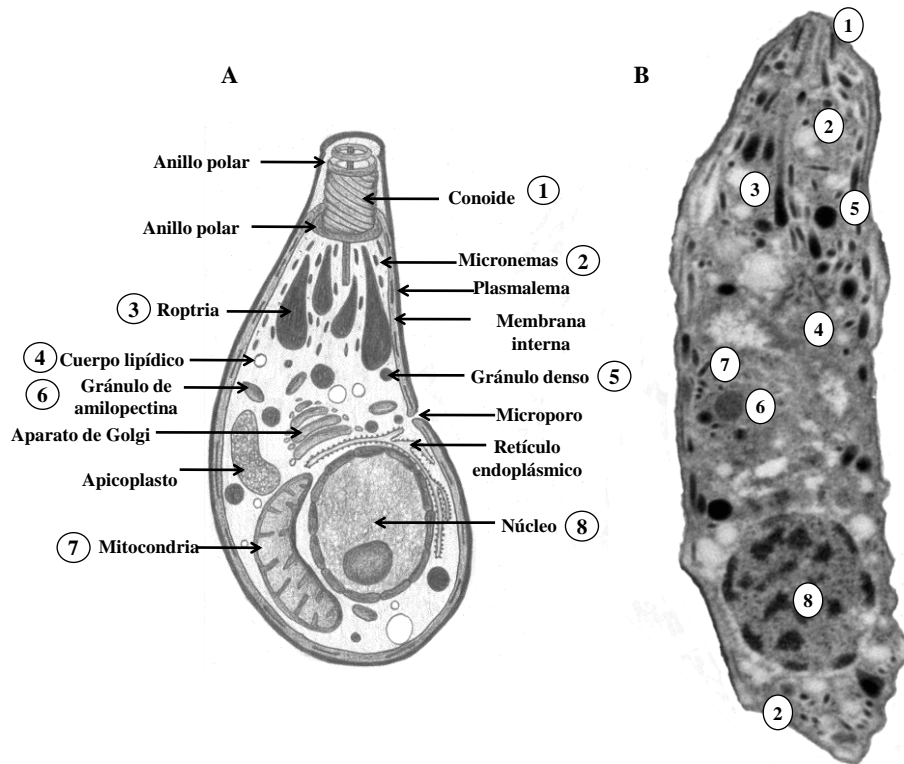


Figura 4. Zoíto de *B. besnoiti*. A: Esquema de las diferentes organelas presentes en los zoítos de *Besnoitia*. B: Imagen de un bradizoíto mediante microscopía electrónica (Fernández-García et al., 2009b).

Los taquizoítos se multiplican rápidamente en macrófagos, fibroblastos y células endoteliales de los vasos sanguíneos durante la fase aguda de la enfermedad. Posteriormente, durante la fase crónica se transforman en bradizoítos (Basson et al., 1970; Cortés et al., 2014), los cuales se multiplican lentamente en el interior de quistes tisulares en células de origen mesenquimatoso (fibroblastos y miofibroblastos) localizadas, principalmente, en el tejido conectivo subcutáneo (Fig. 5) (Langenmayer et al., 2015a).

Los quistes tisulares tienen forma esférica u ovalada y se encuentran rodeados por una pared gruesa exterior (30 μm) y una vacuola parasitófora interior (1 μm), hallándose entre ambas el citoplasma de la

célula hospedadora (5-20 μm) (Dubey et al., 2003a). En la pared exterior se diferencian a su vez una pared externa de fibras de colágeno concéntricas y una más fina interna de 1 μm de grosor formada por partículas de proteoglicano y filamentos que no siempre es visible (Langenmayer et al., 2015a).

Los quistes tisulares de *B. besnoiti* se localizan con más frecuencia en la piel (Fig. 5), la esclerótica, el tracto respiratorio superior, los testículos y el epidídimo en machos y el vestíbulo vaginal en las hembras. No obstante, también han sido descritos en la musculatura, los tendones, el periostio, la lengua, los linfonódulos, el bazo, el hígado y el corazón, entre otros (revisado por Álvarez-García et al., 2014a).

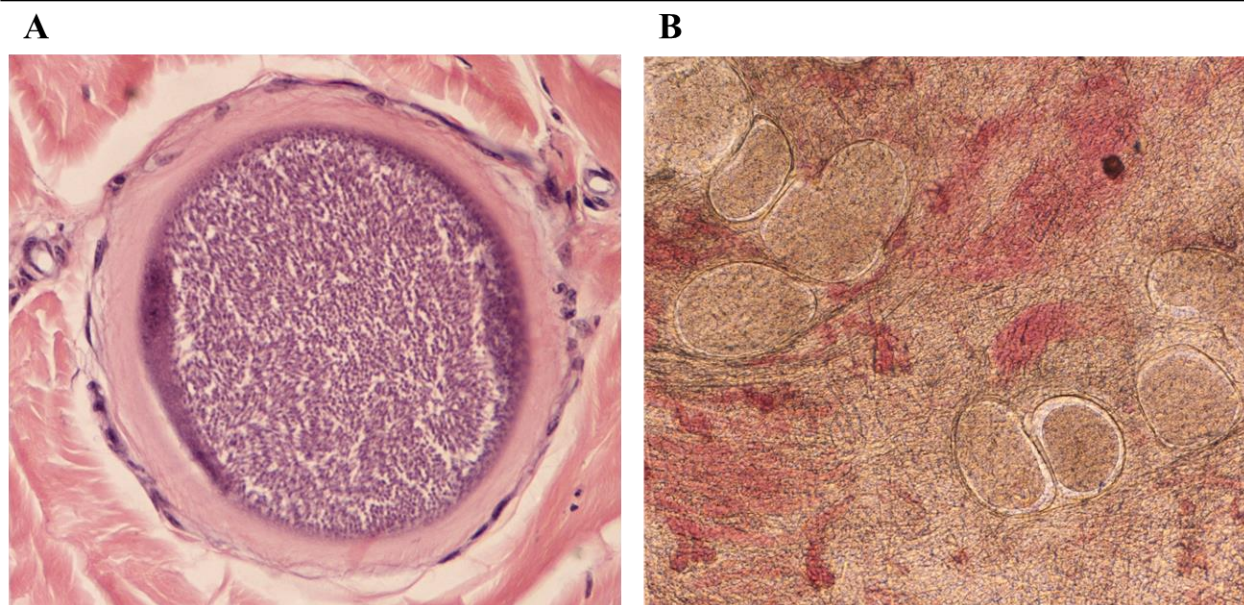


Figura 5. Quistes tisulares de *B. besnoiti*. A: Tinción hematoxilina-eosina. B: Compresión entre dos placas de cristal.

El tamaño del quiste varía según el tiempo de infección transcurrido (Bigalke, 1968). La formación del quiste tiene lugar inmediatamente después de la proliferación del parásito en los vasos sanguíneos, aproximadamente 11 días después de la infección. Sin embargo, el crecimiento es asincrónico (Basson et al., 1970). Por ello, pueden detectarse quistes tisulares simultáneamente con signos clínicos correspondientes a la fase aguda de la enfermedad (Gollnick et al., 2015). Los quistes tisulares inmaduros pueden llegar a contener entre 1 y 4 bradizoítos y medir aproximadamente 20 μm (Basson et al., 1970; Dubey et al., 2013; Langenmayer et al., 2015a). A las 4 semanas post-infección (spi) los quistes tisulares pueden llegar a tener un tamaño de 100 μm , y alcanzarán su máximo desarrollo a las 10 spi (Basson et al., 1970). Los quistes tisulares maduros pueden llegar a medir 390 μm de diámetro, llegando a albergar alrededor de 200.000 bradizoítos en

su interior (Bigalke, 1981). Junto a los quistes tisulares maduros pueden observarse también quistes tisulares degenerados con una intensa respuesta inflamatoria alrededor constituida por neutrófilos, macrófagos, eosinófilos, linfocitos y células multinucleadas (Basson et al., 1970; Frey et al., 2013).

Se denomina quiste degenerado aquel que ha perdido su morfología esférica, tiene la pared externa rota, un infiltrado de células inflamatorias y los bradizoítos en su interior no se identifican correctamente (Frey et al., 2013). Los quistes tisulares degenerados se empiezan a observar, aunque en menor número, a partir de los 30 días post infección (d.p.i) (Basson et al., 1970).

2.3 Transmisión

Los datos epidemiológicos indican que el principal modo de transmisión de *B. besnoiti* es el horizontal (Álvarez-García et

al., 2013), por contacto directo (p.ej. monta natural) o de forma mecánica por medio de artrópodos hematófagos (tábanos y *Stomoxys*). Por su parte, parece improbable la transmisión venérea y la transmisión horizontal por vía oral por consumo de ooquistes no se ha descrito todavía (Fig. 3).

En relación a la transmisión por contacto directo, se ha demostrado que el estadio de bradizoíto es capaz de atravesar la barrera mucosa, ya que Bigalke (1968) reprodujo la enfermedad en 2 bueyes tras la inoculación de 5×10^7 bradizoítos por vía intranasal. Los dos animales infectados presentaron fiebre la primera semana post-infección y quistes tisulares en la esclerótica antes y después del sacrificio (86 y 100 dpi, respectivamente). Por ello, dado que los quistes tisulares se localizan superficialmente en la mucosa del aparato reproductor masculino y femenino (Nobel et al., 1981; Kumi-Diaka et al., 1981), éstos podrían romperse durante la monta natural y los bradizoítos en su interior, al ser liberados, serían capaces de infectar a un nuevo hospedador. Bajo esta premisa, el semental podría suponer un riesgo para las hembras durante el periodo de monta. En relación con este punto, Bigalke (1968), tras varios experimentos de cohabitación entre animales crónicamente infectados y no infectados, concluyó que aproximadamente el 100% de los animales susceptibles se infectan al cabo de un año. Más recientemente, Gollnick et al. (2015) han estudiado la infección natural por *B. besnoiti* mediante la realización de un

estudio de cohabitación en el ganado bovino. En dicho estudio, 5 hembras no infectadas convivieron durante 84 días con 3 hembras con infección crónica y un macho no infectado. Además, 2 hembras con infección aguda fueron incluidas los días 3 y 51 del estudio. Tres de las 5 hembras no infectadas se infectaron a lo largo del estudio y fueron seropositivas. En dos de ellas la presencia del parásito se confirmó durante la fase aguda de la enfermedad, (días 29 y 36), mientras que en la tercera se confirmó en el día 70 y no presentó ningún signo clínico. El modo de transmisión no pudo comprobarse aunque se especula con el contacto directo y la picadura de artrópodos hematófagos. Recientemente, Hornok et al. (2015b) han puesto en entredicho el modo de transmisión por contacto directo ya que en una granja infectada detectaron la seroconversión únicamente en un 3% (5/159) de las vacas que fueron cubiertas por un toro infectado. Sin embargo, el corto periodo de estudio (1 año), la escasa seroprevalencia de las vacas antes del periodo de cubrición (5%) y la falta de una inspección clínica exhaustiva previa que confirmara la presencia de quistes tisulares en el vestíbulo vaginal podrían explicar los resultados.

Respecto a la transmisión mecánica por medio de artrópodos hematófagos, los animales tanto con infección aguda (taquizoítos en sangre circulante) como con infección crónica (quistes tisulares en piel) podrían ser una fuente de infección. En el ganado bovino se ha demostrado

experimentalmente que diferentes especies de tábanos y *Stomoxys* pueden transmitir el parásito de forma mecánica (Bigalke, 1968). De hecho, Gollnick et al. (2015) detectaron ADN de *Besnoitia* spp. en una de las 48 moscas *Stomoxys* recolectadas durante el estudio de cohabitación mencionado anteriormente. Sin embargo, parece que es necesario un número elevado de picaduras para que se produzca la transmisión. Por su parte, la diseminación del parásito a largas distancias parece bastante improbable, ya que el tiempo de supervivencia en los insectos es limitado (Bigalke, 1968). Liénard et al. (2012) detectaron mediante PCR cuantitativa la presencia de ADN de *B. besnoiti* en un recipiente 24 horas (h) después de las picaduras de *Stomoxys* sobre la piel de un animal crónicamente infectado, sin embargo no llegaron a evaluar la viabilidad del parásito.

En relación a la transmisión venérea ésta parece poco probable. Estéban-Gil et al. (2014) demostraron la ausencia de ADN del parásito en el semen de 29 toros seropositivos frente a la infección por *B. besnoiti*, de los cuales 17 no presentaban ningún signo clínico y los 12 restantes presentaban quistes tisulares en la conjuntiva ocular, lesiones cutáneas (hiperqueratosis) y degeneración testicular. Por ello, a pesar de la localización de los quistes tisulares a lo largo de todo el tracto reproductor masculino (Kumi-Diaka et al., 1981; López et al., 2012), éste modo de transmisión no parece jugar un papel importante. La escasa e intermitente

eliminación del parásito podrían explicar la ausencia de ADN en las muestras de semen analizadas. No obstante, la presencia de ADN del parásito en semen tampoco confirmaría la transmisión sexual ya que otros factores como la dosis y la viabilidad del parásito serían determinantes para originar una infección. Estudios similares llevados a cabo en *N. caninum* han demostrado que la carga parasitaria en semen es muy baja y que son necesarias dosis intra-uterinas elevadas ($>10^4$ taquizoítos) para inducir una respuesta inmunitaria específica, demostrándose la transmisión experimental en novillas por ésta vía (Serrano-Martínez et al., 2007a,b).

La transmisión por consumo de ooquistes ha sido estudiada en varias ocasiones. Peteshev et al. (1974) afirmaron haber reproducido el ciclo biológico completo de *B. besnoiti*. En dicho estudio, llevado a cabo en Kazajistán, alimentaron a lobos, perros, zorros, marmotas, cabras, corderos, erizos, ratones, grajos y gatos (domésticos y silvestres) con tejido de ganado bovino crónicamente infectado. Las marmotas murieron a los pocos días a causa de una besnoitiosis aguda mientras que las cabras, los corderos y los ratones desarrollaron la fase crónica de la enfermedad. Finalmente, los tres gatos infectados eliminaron ooquistes a partir de los 13-16 dpi durante un corto periodo de tiempo (3-5 días), sin presentar ningún signo clínico. Dichos ooquistes medían 11,5-14,2 μm x 14,2-16 μm y tras su esporulación presentaban 2 esporoquistes con 4

esporozoítos cada uno. Los ooquistes esporulados fueron a su vez infectantes para las marmotas, los ratones, las cabras, las ovejas y los terneros, los cuales desarrollaron la enfermedad. Posteriormente, Diesing et al. (1988) intentaron reproducir estos resultados alimentando a una amplia variedad de hospedadores con tejido de ganado bovino crónicamente infectado (12, 6 y 1 especies de carnívoros, serpientes y buitres, respectivamente). Ninguna de las especies estudiadas eliminó ooquistes en sus heces durante las 3 semanas de estudio. Recientemente, Basso et al. (2011) y Marcén-Seral (2011) tampoco han conseguido reproducir los resultados de Peteshev et al. (1974) en perros y gatos. No obstante, Marcén-Seral (2011) detectó formas parasitarias compatibles con ooquistes en heces de gatos alimentados con tejido de ganado bovino, si bien sus resultados moleculares no fueron concluyentes.

Finalmente, la transmisión vertical de madre a hija vía calostrual o transplacentaria, por el momento no ha sido confirmada, aunque también parece poco probable. En el primer trabajo realizado en esta línea se demostró la ausencia de anticuerpos precalostrales en terneros cuyas madres estaban crónicamente infectadas y presentaban niveles elevados de anticuerpos, si bien tras el encalostrado, los títulos de anticuerpos oscilaron entre 1:64 y 1:1024 medidos por IFI (Shkap et al., 1994). Sin embargo, no se confirmó o descartó la transmisión calostrual. De forma similar,

Hornok et al. (2015b), recientemente, descartaron la transmisión vertical al describir la ausencia de anticuerpos precalostrales en 15 terneros nacidos de madres seropositivas y la ausencia de ADN del parásito en el calostro de 7 vacas seropositivas.

3. La besnoitiosis bovina

La besnoitiosis bovina es una enfermedad de curso crónico y debilitante que afecta a los parámetros productivos y reproductivos, principalmente, del ganado de carne en condiciones extensivas o semi-extensivas (Álvarez-García et al., 2013). En las últimas décadas se ha observado un aumento en el número de casos y una notable expansión geográfica de la enfermedad en España y en otros países europeos (EFSA, 2010). A pesar de la falta de estudios del impacto productivo y reproductivo de la enfermedad, se piensa que la besnoitiosis bovina podría ser responsable de importantes pérdidas económicas. Todo ello, añadido a la falta de una vacuna o tratamiento eficaces hace recomendable incluir a la besnoitiosis bovina en el programa sanitario de las explotaciones de vaca nodriza, no solo en las zonas donde la enfermedad es endémica sino también en áreas consideradas libres de la enfermedad. Por estos motivos, el control de la enfermedad hoy en día se basa en el sacrificio selectivo de animales clínicamente

afectados y en la monitorización de animales seropositivos (Álvarez-García et al., 2013).

3.1. Distribución geográfica

La besnoitiosis bovina ha sido descrita en varios países del África Subsahariana (Sudáfrica, Botsuana, Namibia, Zimbabue, Angola, Ruanda, Congo, Kenia, Tanzania, Uganda, antigua República del Sudán, Camerún y Nigeria), Asia (Israel, Kazajistán, Uzbekistán, China y Corea del Sur), en el continente americano (Venezuela) y en Europa (Portugal, España, Francia, Alemania, Suiza, Italia, Croacia, Hungría y Bélgica) (Fig. 1, 6).

La besnoitiosis bovina en el continente africano fue descrita por primera vez en Sudáfrica (Hofymer, 1945), país en el que fue ampliamente estudiada desde los años 60 hasta los 80 (Pols, 1960; Bigalke, 1968). No obstante, durante la segunda mitad del siglo XX, también se diagnosticó en gran parte de los países del África subsahariana (Bigalke, 1981) (Fig 6). Actualmente, se desconoce su situación epidemiológica en África, pero se considera que es una enfermedad que compromete las producciones ganaderas, ya que hoy en día se siguen detectando nuevos casos en países como Zimbabue, Sudáfrica o Nigeria (Chatikobo et al., 2013; Dubey et al., 2013; Sambo et al., 2014).

La besnoitiosis bovina en Asia es poco conocida, posiblemente porque la mayor parte de los trabajos, únicamente, se

encuentran publicados en el idioma local, (ruso, chino o coreano), lo cual ha dificultado su divulgación. La enfermedad fue descrita por primera vez en Corea del Sur (Fukushima e Isaki, 1932; citado por Lee et al., 1970). Durante la segunda mitad del siglo XX, se detectaron casos clínicos de la enfermedad en varios países de Asia Oriental, Central y Occidental citados anteriormente. Desafortunadamente, en la actualidad se desconoce la distribución geográfica de la besnoitiosis bovina en el continente asiático.

En cuanto al continente americano, Vogelsang y Gallo (1941), a mediados del siglo XX, describieron una dermatitis parasitaria en dos bovinos en el estado de Aragua (Venezuela). Los autores denominaron inicialmente a esta enfermedad sarcosporidiosis cutánea y fue atribuida al agente *Globidium besnoiti*. Dicha descripción fue la primera y la última en América y, desde entonces, tan solo Uzeda et al. (2014) han realizado un estudio serológico en Brasil en el cual describieron resultados positivos mediante IFI y no concluyentes mediante Western blot.

Respecto a Europa, la enfermedad estuvo, inicialmente, restringida a dos zonas: los Pirineos y la región del Alentejo en Portugal (Fig. 1). Desde las primeras descripciones (Besnoit y Robin, 1912; Franco y Borges, 1915), apenas se realizaron estudios hasta los años 90, a excepción de los casos detectados en Francia a mediados del siglo XX (Franc, 1987). Sin embargo, desde principios de los años 90, han sido

numerosos los brotes descritos en España y Francia así como en otros países limítrofes como Italia, Suiza o Alemania (Alzieu et al., 2007; Schares et al., 2009; Fernández-García et al., 2010; Gentile et al., 2012; Basso et al., 2013) (Fig. 6). A continuación, se detalla la distribución geográfica de la enfermedad en los diferentes países en función de su fecha de aparición.

En Francia, la besnoitiosis bovina se considera endémica en los Pirineos (regiones de Aquitania y Mediodía-Pirineos), donde según Franc (1987), se han descrito casos clínicos desde 1800 a 1986. Posteriormente, Legrand (2003) continuó describiendo casos clínicos desde 1990 a 2001 en el departamento Ariège, situado en la región Mediodía-Pirineos, limítrofe con Lérida y Andorra. Desde entonces la enfermedad se ha diseminado por el centro y sureste del país, detectándose en los Alpes, el Macizo Central y la región PACA (Provenza-Alpes-Costa Azul), donde se han diagnosticado numerosos casos clínicos en los últimos años (Alzieu et al., 2007; Freudiger, 2008; Fouquet, 2009). No obstante, la infección por *B. besnoiti* también ha sido declarada, más recientemente, en los departamentos franceses de Loira y Orne, al noroeste del país (Genest, 2008; Delaffose, 2011), lo que indica una elevada y notable diseminación de la enfermedad en Francia.

En Portugal, la besnoitiosis bovina fue descrita por primera vez en la región del Alentejo (Franco y Borges, 1915), donde la enfermedad se considera endémica

actualmente (EFSA, 2010). Dicha región se localiza en el centro-sur de Portugal, limítrofe con Extremadura y Andalucía. Sin embargo, hasta finales del siglo XX, la enfermedad no fue descrita de nuevo en el país (Malta y Silva, 1991).

Sorprendentemente, Waap et al. (2014), en un estudio transversal realizado en todo el país, han demostrado que la enfermedad sigue estando aún presente en la misma zona, ya que prácticamente la totalidad de los animales seropositivos (90%, 320/355) se localizaron en la región del Alentejo. No obstante, también describieron 4 focos de la infección en la región Centro del país, aunque solo se confirmó la presencia de casos clínicos en uno de ellos. Llama la atención, por lo tanto, que la diseminación de la enfermedad en el país luso no sea tan acusada como en el caso francés o español.

En España, la primera descripción de la enfermedad la realizaron Juste et al. (1990) en varias granjas de Navarra y Vizcaya. Diez años más tarde, Irigoien et al. (2000) describieron la enfermedad en 30 animales de Navarra y el Pirineo Central y, posteriormente, Zacarías (2009) volvió a detectar la infección en 13 granjas de la Sierra de Urbasa-Andía (Navarra). Recientemente, según los resultados obtenidos por Álvarez-García et al. (2014b), la enfermedad en la Comunidad Foral de Navarra estaría restringida a las zonas del Pirineo y la Sierra de Urbasa-Andía.

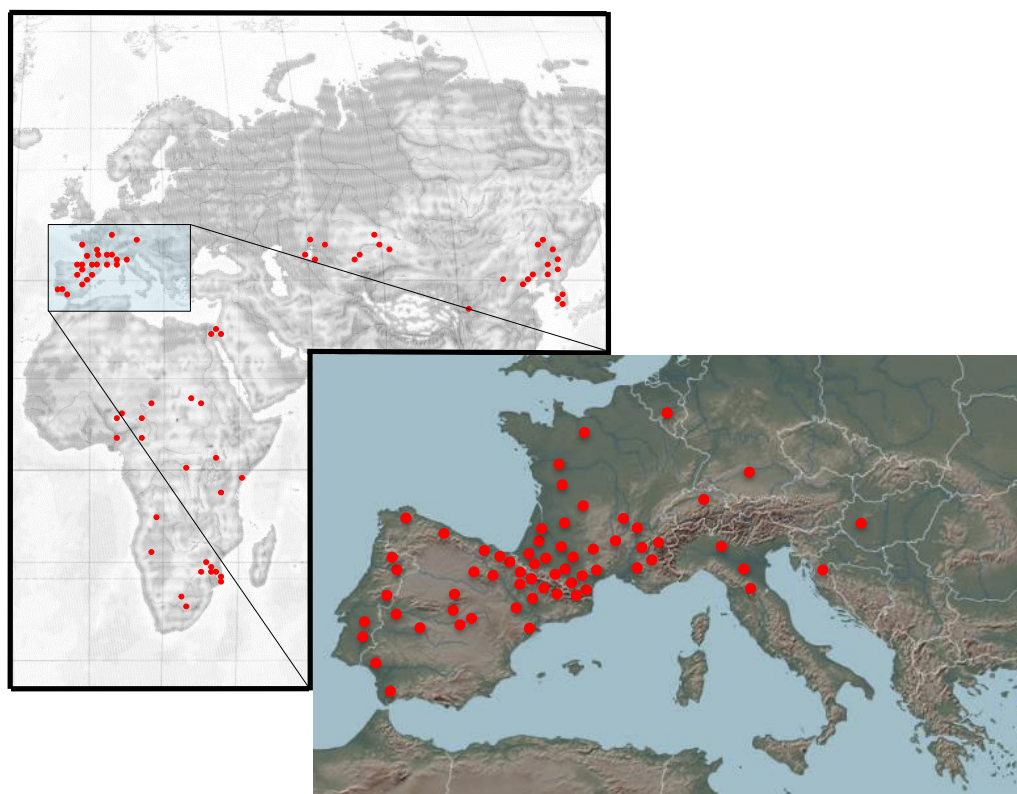


Figura 6: Distribución geográfica de la besnoitiosis bovina (actualización del mapa de Olias et al., 2011)

De hecho, la besnoitiosis bovina en la Península Ibérica se considera endémica en los Pirineos y la Sierra de Urbasa-Andía (EFSA, 2010). No obstante, basándonos en descripciones previas, la enfermedad podría considerarse endémica en otras zonas como el Maestrazgo (Teruel), el País Vasco, Castilla y León y La Rioja. Cabe señalar, al igual que ocurre en Francia, la notable diseminación de la besnoitiosis bovina desde el noreste de España hacia el centro y suroeste del país, destacando la aparición de numerosos brotes epidémicos de la enfermedad (Fig. 6) en Madrid, Castilla-La Mancha, Extremadura y Andalucía, entre otros (Fernández-García et al., 2010; datos no publicados).

En Italia, la primera descripción de la enfermedad tuvo lugar a finales de siglo XX,

en animales importados de Francia (Agosti et al., 1994). Sin embargo, también se han descrito casos clínicos en animales autóctonos sin contacto previo con animales importados en la región Emilia Romagna, en la Italia septentrional cerca de los Apeninos (Gollnick et al., 2010; Gentile et al., 2012). De hecho, Gazzonis et al. (2014) han notificado recientemente la presencia de un foco de la enfermedad en la región de Lombardía, limítrofe con Emilia-Romaña, al norte del país.

Por último, en países como Alemania, Suiza, Croacia, Hungría y, más recientemente, Bélgica, las descripciones de la enfermedad son escasas y se limitan únicamente a la descripción de brotes epidémicos tras la introducción de animales

subclínicamente infectados procedentes de Francia (Schaes et al., 2009; Basso et al., 2013; Beck et al., 2013; Hornok et al., 2014; Vandohout et al., 2015).

3.2. Prevalencia e incidencia

Tras revisar los diferentes estudios de prevalencia e incidencia tanto clínica como serológica llevados a cabo hasta el momento, es importante señalar que hay una falta de uniformidad entre todos ellos debido a las medidas de manejo en las granjas, los diferentes diseños experimentales y las técnicas serológicas empleadas (IFI, ELISA, Western blot y MAT), que hacen que no sean comparables entre sí.

En relación a la prevalencia, los primeros estudios fueron realizados, principalmente, en Sudáfrica y confirmaron que la prevalencia clínica intra-rebaño, generalmente basada en la observación de quistes tisulares en la conjuntiva ocular, era menor del 10%, si bien en algunos rebaños llegaron a alcanzar el 50% (Bigalke, 1968; Janitschke et al., 1984). De nuevo, en Asia, también se describieron prevalencias clínicas intra-rebaño del 6% (285/4725) y del 9% (30/331) en Corea del Sur y Kazajistán, respectivamente. (Lee et al., 1970; Krasov et al., 1975) (Tabla 2).

Más adelante, con el desarrollo de las técnicas serológicas como la IFI o el ELISA, las tasas de seroprevalencia individual detectadas en Sudáfrica e Israel fueron superiores y oscilaron entre el 50% y el 67%

en el ganado de carne y entre el 6,6% y el 37% en el ganado de leche (Neuman et al., 1972a; Frank et al., 1977; Goldman y Pipano, 1983). La seroprevalencia intra-rebaño descrita por Janitschke et al. (1984) varió del 38% al 82%.

Desde entonces, existe poca información acerca de la situación actual de la infección o enfermedad en África y Asia. Igbowkue et al. (2009) detectaron una prevalencia clínica individual del 0,2% en Nigeria. Sin embargo, un estudio reciente llevado a cabo en Zimbabue registró una prevalencia clínica de rebaño del 13,6% (Chatikobo et al., 2013).

En cuanto a la prevalencia serológica, los últimos estudios realizados en Nigeria, Egipto y Jordania detectaron tasas de seroprevalencia individual del 77%, 17% y 6%, respectivamente. No obstante, no existe confirmación clínica de la enfermedad en éstos dos últimos (Tabla 2).

En Europa, lo primeros estudios de prevalencia tuvieron lugar a principios del siglo XXI (Fig. 1). La mayor parte de los trabajos se concentran en Francia y España, siendo más limitada la información en Portugal (Jacquiet et al., 2010; Álvarez-García et al., 2013; Waap, 2015) (Tabla 3). En el resto de países, los datos de prevalencia se limitan generalmente a la descripción de brotes epidémicos. A continuación, se describen las tasas de prevalencia registradas en los diferentes países europeos según la fecha de la aparición de la enfermedad en los mismos.

En Francia, Ferrié (1984) afirmó que la prevalencia clínica de la enfermedad oscilaba entre el 1% y el 10%. Años más tarde, Freudiger (2008) describió valores de prevalencia clínica individual y de rebaño en los Alpes del 0,8% y del 7,3%, respectivamente. Sin embargo, Fouquet (2009) obtuvo una prevalencia clínica de rebaño del 55% (126/229) en la región PACA, basada en la observación de quistes tisulares en la conjuntiva ocular mediante inspección clínica y la detección de otros signos clínicos compatibles con la enfermedad. Curiosamente, el 31,2% de los animales enfermos presentaron signos clínicos graves (edemas, escleroderma) y el 68,8% fueron considerados como portadores al presentar únicamente quistes tisulares en la conjuntiva ocular. Desafortunadamente, no hay datos de prevalencia (clínica o serológica) en el Pirineo Francés hasta el momento, a excepción de un estudio longitudinal realizado por Liénard et al. (2011) que se comentará en la página siguiente.

En Portugal, la enfermedad se ha descrito en contadas ocasiones en la región del Alentejo (Franco y Borges, 1915; Leitaó, 1949; Malta y Silva, 1991; Cortés et al., 2006a). Sin embargo, Waap et al. (2014) han realizado, recientemente, un estudio serológico transversal en todo el país. De un total de 11477 animales muestreados, únicamente 355 (3,1%) fueron seropositivos mediante MAT e IFI. La prevalencia de rebaño fue del 5,1% y la prevalencia intra-rebaño osciló entre el 0,7% y el 74%.

En España, tras las descripciones realizadas por Juste et al. (1990) e Irigoien et al. (2000), Zacarías (2009) detectó una seroprevalencia intra-rebaño superior al 30% en 9 de las 13 granjas muestreadas en la Sierra de Urbasa-Andía (Tabla 3). Posteriormente, un estudio transversal realizado en la Comunidad Foral de Navarra mediante un muestreo aleatorio, registró una seroprevalencia individual del 16% (67/340) en ganado de carne frente a un 0% (2/372) en ganado de leche (Álvarez-García et al., 2014b). Éstos resultados demostraron que la infección estaba restringida al ganado de carne ubicado en zonas montañosas donde se había diagnosticado la enfermedad previamente, como el Pirineo y la Sierra de Urbasa-Andía. Al igual que ocurre en Francia, tampoco se conoce la prevalencia de la besnoitiosis bovina en el Pirineo Español, a pesar de considerarse una zona donde la enfermedad es tradicionalmente endémica.

En Italia, la besnoitiosis bovina no se considera endémica, aunque Gentile et al. (2012) sugirieron la posible existencia de zonas donde la enfermedad sería endémica, como p.ej. los Apeninos. Los datos de prevalencia en Italia se reducen, principalmente, a las descripciones de brotes epidémicos (Tabla 3). En el brote descrito por Gollnick et al. (2010) en una granja del norte de Italia se detectaron unas tasas de prevalencia clínica y serológica del 9,6% y 41,2%, respectivamente. En un segundo brote diagnosticado por Gentile et al. (2012) la tasa de seroprevalencia fue del 9,7%.

Por otro lado, en dos estudios recientes llevados a cabo en el centro y sur del país se obtuvieron elevados valores de seroprevalencia individual (44,1%-52%) y de rebaño (83%-100%) mediante ELISA; sin embargo, los resultados serológicos no fueron confirmados por Western blot y la presencia del parásito tampoco fue probada (Rinaldi et al., 2013; D'Avino et al., 2014). Con el fin de esclarecer la situación de la enfermedad en Italia, Gazzonis et al. (2014) llevaron a cabo un estudio transversal en la isla de Cerdeña y en el norte peninsular del país, donde obtuvieron unos valores bajos tanto de seroprevalencia individual como de rebaño (0,3% y 3,9%, respectivamente) confirmados por Western blot (únicamente 10 animales procedentes de 5 granjas fueron positivos).

Recientemente, la infección por *B. besnoiti* también ha sido estudiada en el norte de Grecia mediante serología, detectándose una seroprevalencia individual del 22% (Papadopoulos et al., 2014). Aunque no se ha descrito aún ningún caso clínico en el país, la enfermedad no debe descartarse.

Por último, los datos de Alemania, Suiza, Croacia, Hungría y Bélgica se limitan a brotes en granjas aisladas (Tabla 3), cuyas tasas de prevalencia clínica y serológica, al igual que los brotes de Italia, varían según el momento en el que fueron diagnosticados. Cuando *B. besnoiti* llega por primera vez a una granja la tasa de seroprevalencia puede llegar al 90% y el porcentaje de animales con signos clínicos a un 40% (Fernández-García

et al., 2010). No obstante, debido a la lenta transmisión de la enfermedad, el mayor número de animales seropositivos y con signos clínicos se alcanza 2 o 3 años después de la detección de los primeros casos clínicos (Pols, 1960; Bigalke, 1968; Cortés et al., 2006a; Fernández-García et al., 2010). Después, con el paso del tiempo (meses o incluso años), y sin adoptar ninguna medida de control, la prevalencia clínica y la tasa de seroprevalencia disminuyen, manteniéndose aún así en niveles elevados (p.ej. 63,7% y 17%, respectivamente) (García-Lunar et al., 2010). Además, la gravedad de los signos clínicos también disminuye.

En cuanto a la incidencia de la enfermedad, existe poca información al respecto. Los escasos estudios publicados hasta el momento no calculan el valor de la tasa de incidencia y, únicamente, describen cómo varía la tasa de prevalencia (serológica o clínica) en los diferentes muestreos, por lo que se desconoce el número de casos incidentes. La prevalencia clínica obtenida por Liénard et al. (2011) en una granja de leche del Pirineo Francés estuvo basada en la presencia de quistes tisulares en la esclerótica ocular y osciló entre el 8,7% y el 22,8% en un periodo de 14 meses, detectándose un mayor número de animales con signos clínicos en los meses de verano. En cuanto a la evolución de la seroprevalencia, observaron un aumento de del 30% al 89,5% en el periodo de estudio.

Por otro lado, Cortés et al. (2006a) realizaron un estudio longitudinal en un

rebaño de aptitud cárnica en la región del Alentejo, en el que observaron un aumento de la seroprevalencia de 36% al 70% en un periodo de 18 meses. Sin embargo, este estudio podría considerarse como un brote ya que los primeros signos clínicos se detectaron un año antes del primer muestreo.

Lo mismo ocurre con el trabajo llevado a cabo por Genest (2008) en la región del Loira (Francia). En este estudio, se describió un aumento de la seroprevalencia del 35% al 52% en un período de 4 años desde la detección del brote y una prevalencia clínica del 42% al final del estudio.

Tabla 2. Prevalencia de la besnoítosis bovina en África y Asia.

Continente	Año	País	Endémica (E) Brote (B) Desconocido (D)	Aptitud	Tamaño muestra		Tipo de muestreo	Técnica serológica*	Prevalencia (Serológica / Clínica) (%)			Referencia
					Animales	Rebaños			Individual	Intra-rebaño	Rebaño	
África	1968	Sudáfrica	E	ND	5493	7	Conveniencia	-	(ND / 8,5)	(ND / 2,1-49,5)	(ND / 100)	Bigalke, 1968
	1984	E	E	ND	303	3	Conveniencia IFI y ELISA	-	(54,5-61,7 / 37,9)	(38,1-82,4 / 33,1-56,9)	(100 / 100)	Janitschke et al., 1984
	2009	Nigeria	E	ND	1780	ND	Conveniencia	-	(ND / 0,2)	-	-	Igbowkue et al., 2009
	2013	E	E	ND	336	ND	Conveniencia IFI*	-	(77 / ND)	-	-	Sambo et al., 2014
	2012	Zimbabue	E	Mixta	ND	294	Aleatorio	-	-	-	(ND / 13,6)	Chatikobo et al., 2013
	2013	Egipto	D	ND	216	ND	Aleatorio	ELISA*	(17 / ND)	-	-	Ashmaway et al., 2014
Asia	1970	Israel	E	Cármica	1671	ND	ND	IFI	(84 / ND)	-	-	Frank et al., 1970
				Lechera					(8 / ND)	-	-	
	1972			Cármica	901	7	Conveniencia IFI	-	(66,9 / ND)	(30-76,2 / ND)	(100 / ND)	Neuman, 1972a
				Lechera	510	2			(37 / ND)	(38-80 / ND)	(100 / ND)	
	1977			Cármica	1309	2	Conveniencia IFI	-	(64,4 / 0,0)	-	-	Frank, 1977
				Lechera	192	5			(10,8 / 0,0)	-	-	
	1983			Cármica	1700	38	Conveniencia IFI	-	(50 / ND)	-	-	Goldman y Pipano 1983
				Lechera		9			(6,6 / ND)	-	-	
	1975	Kazajistán	D	ND	331	1	ND	-	(ND / 9)	-	-	Krasov et al., 1975
	1970	Corea del Sur	D	ND	4725	ND	ND	-	(ND / 6)	-	-	Lee et al., 1970
	2015	Jordania	D	Lechera	806	68	Conveniencia ELISA*	-	(6 / ND)	-	(28,7 / ND)	Talatha et al., 2015

*Presencia del parásito no confirmada

ND: no determinado

Tabla 3. Prevalencia de la besnoitiosis bovina en Europa.

Año	País	Endémica (E) Brote (B) Desconocido (D)	Aptitud	Tamaño muestra		Tipo de muestreo	Técnica serológica*	Prevalencia (Serológica / Clínica) (%)			Referencia
				Animales	Rebaños			Individual	Intra-rebaño	Rebaño	
1990	España	E	ND	9	7	Conveniencia	-	(0 / 100)	-	-	Juste et al., 1990
2009		E	Cárnica	551	13	Conveniencia	IFI y ELISA *	(45 / ND)	(2-97 / ND)	(100 / ND)	Zacarias, 2009
2010		B	Cárnica	358	9	Conveniencia	ELISA y WB	(90,5 / 43)	(85,7-100 / 5-32)	(100 / 100)	Fernández-García et al., 2010
2014		E	Cárnica	372	161	Aleatorio	ELISA *	(16 / ND)	-	-	Alvarez-García et al 2014b
			Lechera	340	254			(0 / ND)	-	-	
2006	Portugal	B	Cárnica	300	1	Conveniencia	IFI	(36-70 / ND)	-	-	Cortes et al., 2006a
2012		E	ND	3583	21	Aleatorio	IFI y MAT*	(2,9 / ND)	(0,6-54,4 / ND)	(33,3 / ND)	Waap et al., 2012
2014		E	ND	11447	257	Conveniencia	IFI y MAT*	(3,1 / ND)	-	(9,7 / ND)	Waap et al., 2014
2008	Francia	E	Lechera	45117	844	Conveniencia	-	(ND / 0,8)	-	(ND / 7,3)	Freudiger, 2008
2009		D	ND	-	229	Conveniencia	-	-	-	(ND / 55)	Fouquet, 2009
2011		E	Lechera	57	1	Conveniencia	ELISA y WB	-	(29,8-89,5 / 8,7-22,8)	-	Liénard et al., 2011
2010	Italia	B	ND	114	1	Conveniencia	IFI	-	(41,2 / 9,6)	-	Gollnick et al., 2010
2012		D	Lechera	321	1	Conveniencia	IFI y WB	-	(9,7 / ND)	-	Gentile et al., 2012
2013		D	Cárnica y lechera	528	88	Aleatorio	ELISA *	(44,1 / ND)	-	(83 / ND)	Rinaldi et al., 2013
2014		D	Cárnica y lechera	3140	126	Conveniencia	ELISA, IFI y WB*	(0,3 / ND)	-	(3,9 / ND)	Gazzonis et al., 2014
2012	Suiza	B	ND	412	114	Conveniencia	ELISA, IFI y WB	(0,5 / ND)	-	-	Lesser et al., 2012
2013		B	ND	650	168	Conveniencia	ELISA, IFI y WB	(0,3 / ND)	-	-	Basso et al., 2013
2013	Croacia	B	Cárnica	156	1	Conveniencia	ELISA	(42,3 / 37)	-	-	Beck et al., 2013
2014	Hungría	B	Cárnica	670	1	Conveniencia	ELISA, IFI, WB	(ND / 1,5)	-	-	Homok et al., 2014
2014	Grecia	D	Lechera	450	15	Conveniencia	ELISA *	(22 / ND)	(0-35 / ND)	-	Papadopoulos et al., 2014

*Presencia del parásito no confirmada

ND: no determinado

3.3. Factores de riesgo y claves de su re-emergencia

La mayor parte de los factores de riesgo asociados a la infección por *B. besnoiti* están estrechamente relacionados con la aptitud ganadera y el sistema de manejo (Cuadro 2), dejando en un segundo plano factores individuales como el sexo y la raza (Álvarez-García et al., 2013). Por ello, la besnoitiosis bovina es más frecuente en el ganado de carne que en el de leche. En relación a las ganaderías de aptitud cárnica es necesario diferenciar las granjas de vaca nodriza de los cebaderos (Cuadro 2). Cabe diferenciar dos sistemas de explotación de vaca nodriza en España: la ganadería de montaña y la ganadería de dehesa. No obstante, en las explotaciones de vaca nodriza también se ceban terneros, los cuales se mantienen en extensivo y son llamados, comúnmente, terneros pasteros. Tanto en los sistemas de montaña como en los de dehesa, el ganado bovino de carne, generalmente, practica la monta natural y se mantiene en extensivo durante largos periodos de tiempo en los cuales comparten pastos con rumiantes silvestres y están expuestos a las picaduras de artrópodos hematófagos (tábanos y *Stomoxys*). Además, en la ganadería de montaña se da la peculiaridad de que los pastos son compartidos con otras granjas de zonas cercanas (pastos comunales), sobre todo en la época estival.

En relación a los factores de riesgo individuales, el sexo no se considera un

factor de riesgo, ya que tanto machos como hembras presentan tasas similares de seroprevalencia (Fernández-García et al., 2010). No obstante, algunos autores afirman que los signos clínicos en sementales parecen ser más evidentes que en hembras (Bigalke, 1968; Jacquet et al., 2010). Sin embargo, ésta observación podría estar sesgada puesto que los machos atraen más la atención del veterinario clínico al desempeñar un papel clave dentro de la granja y ser para muchos ganaderos el animal más valioso (Cuadro 3).

En cuanto a las razas, todas son susceptibles a la infección por *B. besnoiti*. Sin embargo, se ha descrito, principalmente, en razas de aptitud cárnica (Afrikaner, Aubrac, Charolesa, Limusina, Conjunto Mestizo, Parda Alpina, Pirenaica y Rubia de Aquitania, entre otros), asociada a las medidas de manejo (Bigalke, 1981; Álvarez-García et al., 2014b; Hornok et al., 2014).

La edad, sin embargo, se considera un factor de riesgo ya que se ha observado un incremento de la seroprevalencia con la edad, y la incidencia clínica es menor en animales jóvenes (Bigalke, 1968; Fernández-García et al., 2010). Al ser una enfermedad de transmisión horizontal, la infección se presenta con mayor frecuencia en los animales de mayor edad. No obstante, algunos autores afirman que los signos clínicos de la enfermedad se suelen observar, principalmente, en animales de 2 a 4 años (Fouquet, 2009; Jacquet et al., 2010). Sin embargo, se han descrito, recientemente, casos clínicos durante las fases aguda y

crónica en animales menores de 6 meses, confirmados serológicamente mediante Western blot (Diezma-Díaz et al., 2015; Hornok et al., 2014). Con el tiempo, los animales crónicamente infectados pueden experimentar una aparente recuperación

clínica y ser resistentes a las re-infecciones, pero permanecen infectados de por vida y su producción puede quedar mermada (Kumi-Diaka et al., 1981; Nobel et al., 1981; Frey et al., 2013).

CUADRO 2: Situación del vacuno de carne en España

La actual situación socio-económica ha supuesto una serie de cambios en la ganadería que se han traducido en variaciones tanto en el censo como en la producción del sector en general. En particular, el sector vacuno representa en nuestro país el 8,1% de la producción final agraria de España y ha generado aproximadamente 5.400 millones de euros en el último año (www.magrama.gob.es). Dentro de las producciones ganaderas, el vacuno es el tercero en importancia económica en nuestro país, por detrás del sector porcino y del sector lácteo, representando en 2011 aproximadamente el 15,6% de la producción final ganadera y ocupando el quinto puesto europeo en importancia productiva. Los censos de vacuno aumentaron hasta el año 2004 y, posteriormente, disminuyeron. Actualmente, el censo actual de ganado vacuno en España es de 6.070.761 animales, según los datos del SITRAN. Dentro del sector habría que diferenciar las explotaciones que se dedican a la cría de vaca nodriza (2.065.036 cabezas) y, por otro lado, las explotaciones dedicadas a la actividad de cebo de terneros (1.806.417 cabezas). Las explotaciones de vaca nodriza se encuentran, principalmente, en la Cornisa Cantábrica y en las zonas de dehesa (Extremadura y Andalucía), mientras que las explotaciones de cebo están situadas mayoritariamente en Cataluña, Aragón y Castilla-La Mancha. El sector vacuno de carne en España tiene unas características peculiares, tales como las condiciones climáticas, orográficas e incluso sociales que lo diferencian de otros países de la Unión Europea. Las ayudas de la PAC, concedidas a la producción de vacas nodriza, han favorecido a los sistemas ganaderos extensivos basados en el empleo de razas autóctonas adaptadas al medio, potenciándose así el bienestar animal y los valores sociales asociados a estos sistemas. En la enfermedad que nos ocupa es importante tener en cuenta el intercambio de animales vivos entre distintos países o regiones dentro de un mismo país, sobre todo cuando la introducción de nuevos animales se realiza sin control sanitario previo y sin llevar a cabo una adecuada cuarentena. De hecho, la introducción de animales infectados en poblaciones libres a menudo da lugar a brotes epidémicos de la enfermedad con elevadas tasas de infección y la consecuente diseminación de la enfermedad (Fernández García et al., 2010). Dentro del comercio de animales vivos, los intercambios intracomunitarios son los más destacados. Aproximadamente, el 21% de los animales cebados en España son terneros importados. Francia suministra el 42% de animales vivos mayores de 160 kg, y hay muchas probabilidades de que su procedencia sea de zonas donde la enfermedad es endémica. De hecho, la importación de animales procedentes de Francia ha dado lugar a brotes epidémicos en países como Alemania, Suiza, Croacia, Hungría y Bélgica (Schaes et al., 2009; Basso et al., 2013; Beck et al., 2013; Hornok et al., 2014; Vandouht et al., 2015). Además, los animales que se comercializan con más frecuencia en explotaciones de vaca nodriza son los sementales.

Para llegar a entender las claves de la re-emergencia de esta enfermedad, debemos considerar, en primer lugar, la aptitud y el manejo así como las características comunes a todos los sistemas de explotación que son consideradas como factores de riesgo y que han estado siempre presentes: (i) transporte/comercio de animales, muchas veces sin un control sanitario previo; (ii) presencia de animales domésticos o semi-domésticos como perros, gatos o roedores que pueden actuar como hospedadores definitivos o reservorios y que están presentes en cualquier tipo de explotación, y (iii) las medidas de manejo tradicionales como el uso de la monta natural y los pastos comunales.

Sin embargo, cabe preguntarse cuáles han sido los cambios que se han producido en los últimos 20 años para que la besnoitiosis haya experimentado una re-emergencia, principalmente, en el ganado de carne. Podría deberse a varias razones: (i) el censo del ganado bovino de carne se ha incrementado considerablemente en detrimento del ganado de leche, gracias a las ayudas de la PAC; (ii) se ha aumentado el comercio de animales entre países o regiones, sobre todo de toros de raza limusina y charolesa, fundamentalmente, procedentes de Francia a países vecinos con el fin de mejorar las razas bovinas autóctonas, en las cuales se valoran una serie de parámetros que no incluyen en muchos casos el estatus sanitario (Cuadros 2 y 3) (Basso et al., 2013); y (iii) finalmente, el cambio climático podría

influir en las poblaciones de artrópodos, favoreciendo la transmisión mecánica de la enfermedad en verano durante el periodo de máxima actividad, cuando se detecta una mayor incidencia de los casos clínicos (Jacquiet et al., 2010).

3.4. Patogenia, signos clínicos y lesiones

Tras la infección por *B. besnoiti*, el periodo de incubación previo a la aparición de los primeros signos clínicos de la enfermedad varía de 1 a 13 días. Posteriormente, la besnoitiosis bovina progresa en dos fases secuenciales: (i) la fase aguda, producida por la multiplicación rápida del parásito (estadio de taquizoíto) en el interior de las células endoteliales de los vasos sanguíneos; y (ii) la fase crónica o de escleroderma, producida por la multiplicación lenta del parásito (estadio de bradizoíto) en el interior de los quistes tisulares en células de origen mesenquimatoso (fibroblastos y miofibroblastos) del tejido conectivo. La muerte puede ocurrir tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la enfermedad, aunque las tasas de mortalidad son bajas (1%) (Jacquiet et al., 2010).

3.4.1 Fase aguda

Durante esta fase, los taquizoítos se localizan en sangre circulante o bien

multiplicándose en el interior de células endoteliales (Bigalke, 1968; Basson et al., 1970). La replicación rápida del parásito tiene, posiblemente, un efecto tóxico que produce un aumento de la permeabilidad vascular. La fase aguda se caracteriza por un cuadro de hipertermia (40,8°C a 41,6°C), depresión, taquicardia, taquipnea, mucosas congestivas, inapetencia y pérdida de peso, que pueden pasar desapercibidos para el veterinario (Jacquet et al., 2010). Dicho cuadro de hipertermia puede ocasionar indirectamente abortos (Nobel et al., 1981). Además puede aparecer hiperemia

conjuntival, lagrimeo, fotofobia y descarga mucopurulenta tanto nasal como ocular (Gollnick et al., 2015). Por último, el aumento de la permeabilidad puede dar lugar a edemas, principalmente en zonas declives del cuerpo como cuello, pecho y bajo vientre, incluso en articulaciones dando lugar a cojeras (Bigalke y Prozesky, 2004; Gollnick et al., 2015) (Fig. 7). En esta fase se observan lesiones vasculares que dan lugar a hemorragias, vasculitis, trombosis e infartos especialmente en capilares y venas de pequeño calibre (Basson et al., 1970).

CUADRO 3: El semental

En la compra y venta de animales reproductores debemos de prestar especial atención a los sementales, ya que la transmisión horizontal mediante el contacto directo durante la monta natural está considerada como uno de los principales modos de transmisión de la enfermedad y la introducción de animales infectados en granjas libres da lugar a brotes de la enfermedad (Basso et al., 2013; Hornok et al., 2014). El semental constituye un factor fundamental para obtener unos buenos datos productivos y reproductivos, ya que es el responsable del 50% de la fertilidad de una ganadería (Serrano, 2014). Los sementales son ejemplares valiosos que, sin embargo, representan un porcentaje reducido dentro del efectivo de la granja (3%-5%). El número de toros por vaca va a depender del sistema de explotación. En la actualidad se realiza, frecuentemente, la cubrición por lotes con un único toro, con fines de selección y para facilitar el manejo. Por ello, es importante un buen examen del toro previo a la época de monta. A la hora de seleccionar un macho para la reproducción es imprescindible prestar atención a su estado general y, fundamentalmente, a sus aplomos, perímetro y consistencia testicular, con el objetivo de detectar posibles enfermedades que afecten a la fertilidad. En las primeras montas es preciso también comprobar la calidad seminal y vigilar la libido, comprobando que realmente cubren a las vacas. En zonas donde la enfermedad es endémica, el veterinario clínico debe tener presente los signos clínicos compatibles con la besnoitiosis bovina a la hora de realizar el examen, ya que da lugar a esterilidad (total o parcial) y pérdida de libido en los sementales afectados (Kumi-Diaka et al., 1981; Sekoni et al., 1992), por lo que en las granjas en las que el papel del semental juega un papel crucial para la fertilidad de la explotación la infección del macho supone una importante pérdida económica, no solo por el semental en sí sino por las pérdidas productivas de las vacas que no quedan gestantes. Del mismo modo, la introducción de nuevos sementales libres de la enfermedad en granjas donde la besnoitiosis es endémica, supone importantes pérdidas económicas para el ganadero, ya que los sementales se pueden infectar al montar a las hembras infectadas, desarrollando esterilidad en un elevado número de los casos (Bigalke, 1968; datos no publicados).

3.4.2 Fase crónica

Durante la fase crónica, el taquizoíto se transforma en bradizoíto y se multiplica lentamente en el interior de quistes tisulares, los cuales tienen tropismo por el tejido conectivo de membranas mucosas, capas superficiales de la piel, tracto respiratorio superior y genital, aunque también se han descrito en diferentes órganos internos (McCully et al., 1966; Nobel et al., 1981; Frey et al., 2013). Los quistes tisulares aparecen en los mismos tejidos donde tuvo lugar la proliferación inicial en las células endoteliales. En ésta fase se observan lesiones cutáneas caracterizadas por un progresivo endurecimiento, hiperqueratosis, alopecia, formación de pliegues e incluso desprendimiento de la piel a consecuencia de la presencia de quistes tisulares en el tejido subcutáneo (Fig. 7). Los quistes tisulares presentes en la conjuntiva ocular son patognomónicos (Bigalke y Naude, 1962) y también se pueden encontrar en el vestíbulo vaginal en el caso de las hembras (Álvarez-García et al., 2014a) (Fig. 7). Aquellos animales con una gran carga parasitaria presentan mala condición corporal y lesiones asociadas a infecciones bacterianas secundarias, generalmente en la zona distal de las extremidades (carpos y tarsos) y en la ubre en el caso de las hembras (Fig. 7).

En los machos, uno de los efectos más importantes es la esterilidad o infertilidad, originada por una orquitis necrotizante que aparece, inicialmente, durante la fase aguda

(Neuman, 1972b). Posteriormente, durante la fase crónica, los quistes tisulares localizados en tubúlos seminíferos y plexo pampiniforme producen una disminución del riego sanguíneo, mientras que aquellos localizados en la piel del escroto reducen considerablemente el intercambio de calor. Las repercusiones clínicas se traducen en una atrofia de los testículos y el epidídimo, necrosis y mineralización que terminan ocasionando azoospermia y esterilidad en el semental (McCully et al., 1966; Kumi-Diaka et al., 1981). En el caso de los machos subclínicamente infectados, Cortés et al. (2006d) compararon la calidad seminal del semen fresco y descongelado en 3 sementales subclínicamente infectados y 5 no infectados. No observaron diferencias en el semen fresco; sin embargo, la motilidad de los espermatozoides en el semen descongelado procedente de machos con una infección subclínica fue significativamente menor que en los no infectados. En el caso de las hembras, a pesar de estar crónicamente infectadas estas pueden quedar preñadas, localizándose los quistes tisulares en el tracto genital caudal (vestíbulo vaginal y vulva), aunque también hay descripciones en miometrio y endometrio de cuernos uterinos (Nobel et al., 1981; Frey et al., 2013).

Por último, Gollnick et al. (2015) han detectado quistes tisulares en el corion de las pezuñas, los cuales son responsable de un fallo en la irrigación y la consecuente laminitis que produce cojeras durante la fase crónica de la enfermedad.



Figura 7: Signos clínicos asociados a la infección por *B. besnoiti*. Signos clínicos desarrollados en fase aguda: orquitis (A), edemas en cuello y pecho (B-C) (García-Lunar et al., 2011). Signos clínicos desarrollados en fase crónica: alteraciones cutáneas (hiperqueratosis y plegamiento) (D), grietas en ubres (E) (Álvarez-García et al., 2014a), quistes tisulares en el vestíbulo vaginal (F) (García-Lunar et al., 2011), alopecia periorcular (G) (Diezma-Díaz et al., manuscrito en preparación) y quistes tisulares en conjuntiva ocular (H) (Álvarez-García et al., 2014a).

3.5. Diagnóstico y control

3.5.1. Diagnóstico

Para el diagnóstico de la besnoitiosis bovina se debe realizar en primer lugar una rigurosa inspección clínica durante la visita a la explotación, en la que se buscará cualquier signo clínico compatible con las fases aguda o crónica de la enfermedad (Fig. 7-8). Tras la inspección clínica se tomará una muestra de sangre y una biopsia cutánea en el caso de encontrar lesiones. La biopsia será utilizada para realizar un diagnóstico laboratorial directo. Con la muestra de sangre se llevará a cabo un análisis serológico para la detección

indirecta de anticuerpos específicos frente a *B. besnoiti* (Fig. 8). Si, finalmente, el resultado de la biopsia o la serología son positivos se deberán tomar unas medidas de contención de la enfermedad para así evitar su diseminación. Si ambos resultados son negativos, consideraremos a la granja como no infectada mientras que si la inspección clínica ha resultado ser positiva y la serología negativa, recomendaremos re-muestrear al animal para descartar un posible resultado falso negativo o dar tiempo a una seroconversión en el caso de que los signos clínicos fueran compatibles con la fase aguda de la enfermedad.

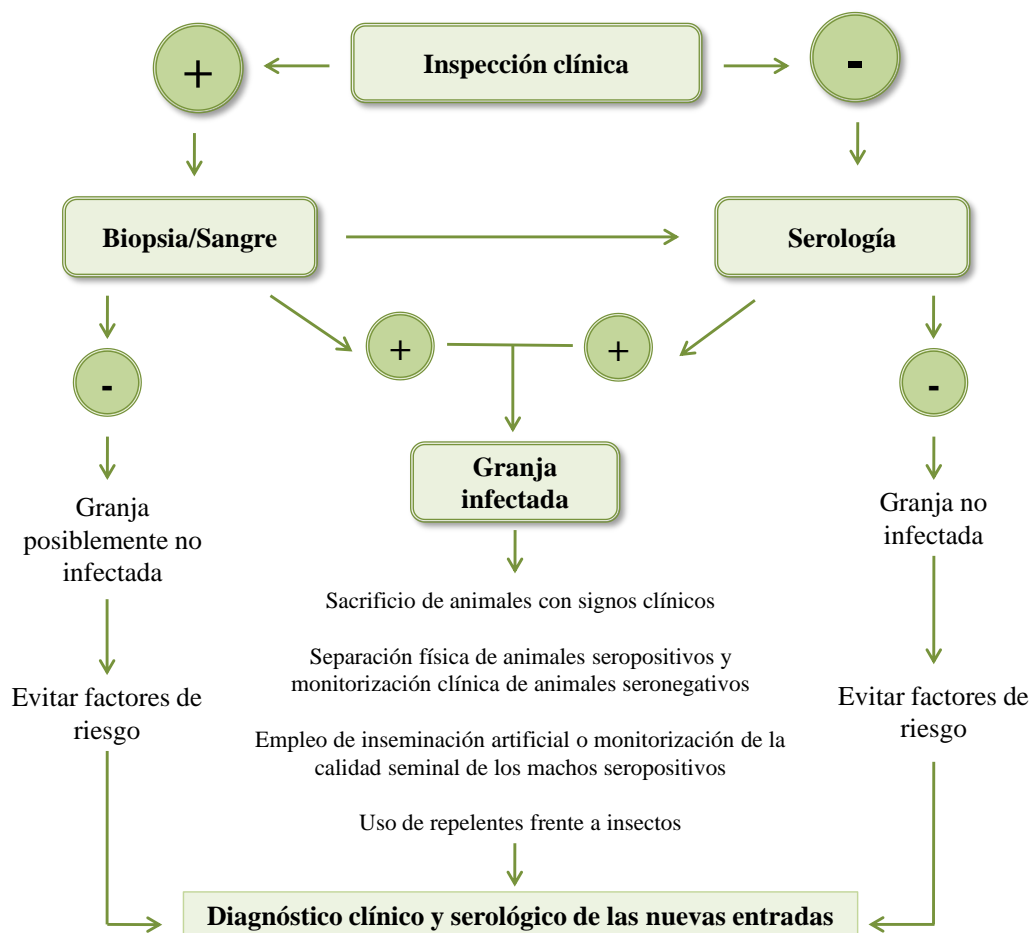


Figura 8. Diagnóstico y control de la besnoitiosis bovina.

3.5.1.1. Diagnóstico epidemiológico

A la hora de realizar el diagnóstico de la besnoitiosis bovina, nos servirán de ayuda los datos epidemiológicos de la explotación. Las prácticas de manejo utilizadas deben ser consideradas como factores de riesgo, ya que el uso de pastos comunales y el empleo de la monta natural pueden favorecer la transmisión de la enfermedad. Si la granja se encuentra localizada en una zona donde la besnoitiosis es endémica, el riesgo de que la enfermedad entre en el rebaño es elevado. En este caso deberemos conocer también el historial clínico de la granja, puesto que la infección por *B. besnoiti* y su entrada en una explotación puede pasar desapercibida o ser confundida con otra enfermedad. Por último, es fundamental conocer el movimiento de animales de la granja, sobre todo el estado sanitario de las nuevas incorporaciones.

3.5.1.2. Diagnóstico clínico

Durante la inspección clínica, debemos tener en cuenta que la mayor parte de los signos clínicos compatibles con las fases aguda y crónica de la besnoitiosis bovina son inespecíficos (Ver apartado 3.4) y pueden observarse también en otras enfermedades. Los signos clínicos durante la fase aguda son similares a los observados en varias infecciones víricas (p.ej. lengua azul o fiebre catarral maligna), mientras que los signos clínicos de la fase crónica a menudo son

atribuidos a infecciones fúngicas (dermatofitosis), parasitarias (sarna), deficiencias en oligoelementos y fotosensibilidad (Cortés et al., 2014). Durante la fase crónica la detección macroscópica de quistes tisulares en la conjuntiva ocular o en el vestíbulo vaginal tiene un gran valor diagnóstico. De hecho los quistes en conjuntiva ocular son considerados patognomónicos de la infección por *Besnoitia* (Bigalke y Naude, 1962; Njagi et al., 1998; Álvarez-García et al., 2014a).

3.5.1.3. Diagnóstico laboratorial

3.5.1.3.1. Directo

La presencia del parásito puede ser confirmada mediante la observación microscópica de quistes tisulares en biopsias (Fig. 5) o mediante la detección de ADN del parásito gracias al empleo de técnicas moleculares (PCR).

Inicialmente, Sannusi (1991) propuso la impronta de un raspado de piel o de la conjuntiva ocular como método diagnóstico, siendo útil y ventajosa a nivel de campo. Después, Fernández-García et al. (2010) detectaron los quistes tisulares microscópicamente tras la compresión de biopsias de piel entre dos placas de cristal. No obstante, si el número de quistes tisulares es bajo, éstas técnicas pueden ser poco sensibles.

Para el diagnóstico directo mediante técnicas moleculares, se puede utilizar tanto una biopsia como una muestra de sangre completa. Considerando la región ITS-1 como un buen marcador filogenético (Tenter, 2002), Cortés et al. (2007b) pusieron a punto una PCR convencional que amplifica dicho fragmento. La muestra de sangre podría ser de gran valor si el animal presenta signos clínicos compatibles con la fase aguda de la enfermedad para detectar parasitemia, ya que durante los primeros días no ha habido tiempo suficiente para la formación de quistes tisulares ni para la producción de anticuerpos específicos. No obstante, la biopsia también puede ser útil durante la fase aguda, ya que hay multiplicación activa del parásito en el interior de las células endoteliales de los pequeños capilares sanguíneos del tejido subcutáneo (Schaes et al., 2013). Asimismo, Cortés et al. (2007b) y Schares et al. (2011b) desarrollaron también una PCR cuantitativa a tiempo real, que ha sido empleada para estudios de distribución orgánica y detección del parásito en artrópodos (Frey et al., 2013; Gollnick et al., 2015). En éste sentido, ya existen en el mercado varias pruebas diagnósticas basadas en la PCR (p.ej. ADIAVET™ y VetPCR™, distribuidas por Biomerieux® y Bioingentech®, respectivamente), aunque su uso en el diagnóstico rutinario de la enfermedad no está muy extendido actualmente. Además, dichas técnicas no especifican el fragmento amplificado ni los valores de sensibilidad (Se) y especificidad (Esp). Por último, cabe

señalar que todas las técnicas moleculares desarrolladas para el diagnóstico de la infección por *B. besnoiti* podrían ser utilizadas para el diagnóstico directo de la besnoitiosis en otras especies de rumiantes (domésticos y silvestres), ya que la región ITS-1 es idéntica en todas las especies de *Besnoitia* que afectan a ungulados (ver apartado 2.1).

3.5.1.3.2. Indirecto

El análisis serológico permite corroborar el diagnóstico directo y detectar animales portadores con infecciones subclínicas (aparentemente sanos, seropositivos y, posiblemente, con un bajo número de quistes tisulares) (Fernández-García et al., 2010; Frey et al., 2013) (Fig. 8). Se han desarrollado diferentes técnicas serológicas, como la IFI, la MAT, el ELISA y el Western blot, siendo estas dos últimas las más utilizadas. Sin embargo, las pruebas serológicas actuales presentan dos limitaciones: (i) baja sensibilidad en animales con infección aguda que no han desarrollado aún anticuerpos específicos y en animales con infección crónica pero con bajos niveles de anticuerpos, por debajo de los límites de detección de las pruebas empleadas (Fernández-García et al., 2010; García-Lunar et al., 2013a); y (ii) problemas de especificidad por reacciones cruzadas con otros parásitos apicomplejos en el caso de la IFI y el ELISA (Nasir et al., 2012; Rinaldi et al.,

2013; Gazzonis et al., 2014). Recientemente, un estudio llevado a cabo por García-Lunar et al. (2015) demostró que las reacciones cruzadas detectadas con la prueba ELISA frente a antígenos de *B. besnoiti* están asociadas no sólo con la presencia de anticuerpos específicos frente a la infección por *N. caninum* o *Sarcocystis* spp., si no también con un elevado nivel de los mismos.

La mayor parte de las técnicas desarrolladas hasta el momento se basan en el uso de taquizoítos, como antígeno, los cuales se obtienen *in vitro* de forma rutinaria en cultivos celulares (Shkap et al., 2002; Cortés et al., 2006b; Fernández-García et al., 2009a; Schares et al., 2009), si bien es cierto que el uso de bradizoítos también ha sido descrito (García-Lunar et al., 2013a). En el caso de la IFI y la aglutinación se utilizan taquizoítos completos como antígeno, mientras que para el ELISA y el Western blot se utiliza un extracto proteico del parásito (soluble o total).

La IFI fue la primera técnica desarrollada para el diagnóstico serológico de la besnoitiosis bovina (Neuman, 1972a) y fue considerada por algunos autores como la técnica "gold standard" (Kaggwa et al., 1979; Shkap et al., 2002). Sin embargo, otros autores señalan que los resultados de ésta técnica son subjetivos ya que dependen de la experiencia y criterio individual del operario (Cortés et al., 2014). Además, se han descrito reacciones cruzadas con anticuerpos anti-*N. caninum* a títulos elevados (Shkap et al.,

2002). Por ello, no se recomienda como prueba diagnóstica rutinaria.

La prueba de aglutinación se ha usado, exclusivamente, en los estudios realizados por Waap et al. (2011, 2014). La principal ventaja radica en la capacidad de detectar anticuerpos frente al agente sin la necesidad de emplear anticuerpos secundarios específicos de especie. No obstante, la pérdida de las características morfológicas de los taquizoítos durante el procesado puede repercutir en las características diagnósticas de la técnica. Además, no deben descartarse las reacciones cruzadas con otros parásitos apicomplejos (Waap et al., 2011).

El ELISA es la técnica más utilizada a la hora de analizar un gran número de muestras, habiendo actualmente en el mercado varias pruebas ELISA comerciales (PrioCHECK Besnoitia Ab V2.0, INGEZIM BES 12.BES.K1 INGENASA, ID Screen Besnoitia indirect IDVET) y ELISAs caseros (García-Lunar et al., 2013a). Además, Schares et al. (2013) han desarrollado un ELISA casero de aidez capaz de diferenciar animales con infección aguda de animales con infección crónica mediante el uso de antígenos de membrana del taquizoíto purificados por afinidad.

Por último, el Western blot es una técnica sensible y específica sin embargo, ésta es más laboriosa y costosa, ya que requiere más experiencia que las anteriores. Se han empleado diferentes protocolos de trabajo y criterios de positividad. En este sentido, Schares et al. (2010) establecieron

como criterio de positividad el reconocimiento de al menos 4 de 10 bandas inmunodominantes, mientras que García-Lunar et al. (2013a) dividieron el patrón de reconocimiento en tres áreas antigénicas y determinaron como criterio de positividad el reconocimiento de tres bandas inmunodominantes en al menos dos de las tres áreas antigénicas (Fig. 9). No obstante, los valores de Se y Esp son elevados en ambos casos incluso cuando se empleó antígeno de bradizoíto (García-Lunar et al., 2013a).

Tras la evaluación de las técnicas empleadas de forma rutinaria en el diagnóstico de la besnoitiosis bovina, y con el objetivo de establecer un protocolo de diagnóstico común, en un estudio comparativo inter-laboratorial los resultados demostraron que cualquiera de las pruebas ELISA disponibles podría emplearse tanto en estudios epidemiológicos como para llevar a cabo un plan de control, gracias a las buenas características diagnósticas y a su fácil realización (García-Lunar et al., 2013a). Sin embargo, no se recomienda el empleo de las pruebas de IFI para realizar un diagnóstico rutinario, ya que dan lugar a un mayor número de resultados discordantes. Por otra parte, se considera el Western blot basado en extracto de taquizoíto y bradizoíto en condiciones no reductoras como la prueba de referencia, ya que estas pruebas mostraron los valores más elevados de Se y Esp. Por ello, se recomienda el empleo del Western blot para confirmar el diagnóstico en el caso de animales con resultados dudosos, en el

diagnóstico de la infección natural en el ganado antes de su entrada en rebaños libres de la infección y en animales valiosos como sementales antes de su sacrificio selectivo.

3.5.2. Control

3.5.2.1. Bioseguridad y biocontención

El control de la besnoitiosis bovina es complicado, ya que no existen tratamientos ni vacunas eficaces y la diseminación de la

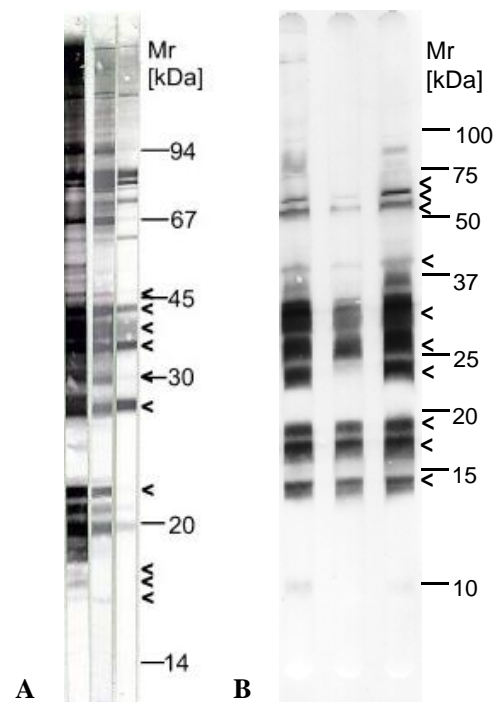


Figura 9. Patrón de reconocimiento de antígenos de taquizoítos de *B. besnoiti* mediante Western blot en condiciones no reductoras. A: Diez antígenos inmunodominantes descritos por Schares et al. (2010) (45, 40, 37, 34, 30, 27, 22, 17, 16 y 15 kDa). B: Diez antígenos inmunodominantes agrupados en 3 áreas antigénicas descritos por García-Lunar et al. (2013a) (Area I: 72,5, 58,9, y 51,4 kDa, Area II: 38,7, 31, 8 y 28,5 kDa y Area III: 23,6, 19,1, 17,4 y 14,5 kDa).

enfermedad está ligada a determinadas prácticas de manejo que dificultan el control (uso de pastos comunales en primavera y verano, monta natural, movimiento de

animales sin control previo del estado sanitario, etc.) (Álvarez García et al., 2013). Por lo tanto, la implantación de unas adecuadas medidas de bioseguridad junto con un diagnóstico precoz juegan un papel crucial en el control de la enfermedad, el cual debería tener dos objetivos principales: por un lado, evitar la entrada de la infección al rebaño (bioseguridad) y, por otro, evitar su diseminación (biocontención) (Fig. 8).

Evitar la entrada de la infección en un rebaño es prioritario, ya que la mayoría de los brotes descritos en diferentes países europeos han ocurrido tras la introducción de animales portadores subclínicamente infectados cuyo estado sanitario previo se desconocía (Basso et al., 2013). Además, si los rebaños libres de la enfermedad se encuentran en zonas donde la infección es endémica, se deben evitar las prácticas de manejo que favorezcan la transmisión de la enfermedad. Si esto no es posible, todos los animales deberían ser examinados al final de la temporada de pastoreo. Posteriormente, los animales infectados deberían ser eliminados del rebaño. Si el número de animales infectados es elevado, su sacrificio no es asumible, por lo que estos animales deberán manejarse de forma separada del resto de animales no infectados de la granja.

El segundo objetivo es más complejo, ya que consiste en evitar la diseminación de la enfermedad en una granja ya infectada. Reducir la prevalencia de la infección dentro de un rebaño no resulta fácil desde un punto de vista práctico. Una estrategia

conservadora, y que a largo plazo parece ser la mejor opción, consiste en mantener un equilibrio entre el sacrificio selectivo y las producciones, ya que la seroprevalencia puede ser elevada en un rebaño infectado (Bigalke, 1968; Kumi-Diaka et al., 1981) y el sacrificio de todos los animales seropositivos resulta inviable desde un punto de vista económico. Por ello, sólo los animales más gravemente afectados e improductivos (p.ej. machos estériles y hembras con baja condición corporal) han de ser reemplazados por animales sanos y seronegativos, que deberán ser mantenidos aislados del resto del rebaño infectado en la medida de lo posible. Además, se recomienda el uso de la inseminación artificial en granjas donde la enfermedad es endémica ya que el riesgo de que un semental recién introducido adquiriera la infección es elevado (Cuadro 3). Si a pesar de la presencia de la enfermedad, se sigue practicando la monta natural, se dividirá el rebaño en dos lotes: animales infectados y no infectados, utilizando sementales seropositivos y seronegativos fértiles en cada uno de los lotes, respectivamente. Asimismo, en el caso de los sementales seropositivos es recomendable monitorizar la calidad seminal regularmente.

Para seleccionar a los animales destinados a la reposición es necesario realizar una monitorización individual clínica y productiva. Esta medida se puede aplicar más fácilmente en ganado intensivo que en extensivo. Las condiciones de manejo intensivo (o semi-extensivo), donde se lleva a

cabo tanto la inseminación artificial como una monitorización de los parámetros productivos, y no se realiza pastoreo, favorece la posibilidad de separar animales sanos de aquellos infectados que habrán de ser sustituidos. Por lo tanto, la probabilidad de eliminar la enfermedad es mayor en éste último caso.

El uso de repelentes de insectos en el interior del establo para reducir las picaduras de insectos hematófagos puede ayudar a disminuir la transmisión mecánica, ya que la seroconversión se ha asociado a periodos de máxima actividad de las moscas de los establos (Liénard et al., 2011). Bajo condiciones de manejo extensivo, sin la posibilidad de analizar regularmente a los individuos, separar en grupos y evitar la transmisión por insectos picadores, la erradicación puede resultar un objetivo imposible. Sin embargo, la ausencia de signos clínicos en el rebaño puede ser un objetivo razonable, que se puede lograr con la inspección visual periódica de los animales para identificar nuevos casos clínicos y eliminar los animales infectados. Por todo ello, las herramientas diagnósticas son clave para implementar y monitorizar la eficacia de los programas de control.

3.5.2.2 Inmunoprofilaxis y tratamiento

No existen actualmente fármacos disponibles frente a esta enfermedad ni vacunas autorizadas en Europa.

En relación al posible empleo de vacunas para prevenir la enfermedad, se han realizado dos experiencias basadas en el empleo de vacunas vivas empleando aislados atenuados en Sudáfrica y en Israel (Bigalke et al., 1974; Shkap, 1986). En relación con el primer estudio, el empleo de un aislado vivo atenuado de *B. besnoiti* obtenido a partir de un ñu crónicamente infectado evitó la aparición de signos clínicos en casi la totalidad de los animales inmunizados (93,5%) tras 4 años de la inoculación de 2×10^6 taquizoítos vía subcutánea. El porcentaje de animales vacunados que presentaron quistes tisulares en conjuntiva ocular osciló entre el 0% y el 1,7%, mientras que en el grupo de animales no vacunados la presencia de dichos quistes tisulares varió del 4,1% a 35%. En Israel, también se ha descrito que la vacunación con un aislado vivo atenuado procedente de un toro crónicamente infectado protege frente al desarrollo de signos clínicos. Sin embargo, no se han realizado estudios de eficacia. Actualmente, en Israel la vacunación frente a *B. besnoiti* no es obligatoria, pero su uso está ampliamente extendido mayoritariamente en machos jóvenes entre 9 y 12 meses de edad, tanto importados como autóctonos. El protocolo de vacunación consiste en una única inoculación vía subcutánea de 2×10^8 taquizoítos (2 ml) previamente criopreservados en suero fetal bovino con DMSO al 10% (Shkap, comunicación personal).

En cuanto a los fármacos, su utilidad reside en la capacidad para luchar frente al estadio de taquizoítos responsable de la fase aguda de la enfermedad y así evitar la diseminación intra-orgánica y el acantonamiento del parásito. Por ello, la mayor parte de los experimentos *in vivo* que se han realizado hasta el momento han sido durante la fase aguda. El tratamiento de animales en fase crónica resulta poco eficaz, posiblemente debido a la limitada accesibilidad del fármaco al interior de los quistes tisulares. Sin embargo, en esta fase, el tratamiento con antibióticos, anti-inflamatorios y una buena alimentación han demostrado un cierto efecto beneficioso (Bigalke y Prozesky, 2004).

En el ganado bovino, los primeros tratamientos *in vivo* fueron llevados a cabo por los franceses Berthelon y Labeyrie en el año 1938 (citado por Franc y Cardiegues, 1999), los cuales inocularon formol por vía intravenosa. Más tarde, Leitao (1949) y Herin (1952) en Portugal y Ruanda, respectivamente, inocularon también formol al 10% durante las fases aguda y crónica de la enfermedad. Ninguno de los dos autores evaluó los efectos de dicha inoculación, pero ambos opinaron que resultó ser beneficioso. Más tarde, Uvaliev y Baigaziev (1979) propusieron un tratamiento frente a la fase crónica de la enfermedad durante 45 días basado en la aplicación local de un tópico hecho a base de un hongo (*Mycena Chorophos*) junto con la inyección intravenosa de Lugol.

Posteriormente, se probaron otros compuestos: (i) la inoculación por vía parenteral de 30-50 ml/100 kg peso vivo (p.v)/48 h de sulfametazina al 33% durante 5 días era considerada efectiva si se realizaba durante la fase aguda de la enfermedad (Franc y Cardiegues, 1999); (ii) el tratamiento con toltrazuril (Baycox®) administrado por vía oral a una dosis de 80 ml/100 kg p.v mezclado con 40 ml de propilenglicol y 40 ml de agua era muy costoso y el resultado fue variable según el clínico consultado (Franc y Cardiegues, 1999); (iii) el uso de 2 inyecciones de parvacuona (Clexon®) vía intramuscular a una dosis de 40 mg/kg con un intervalo de 48 h redujo los signos clínicos cutáneos y eliminó los quistes tisulares en conjuntiva ocular en un tercio de los animales tratados (Sahun, 1998); (iv) la administración de 3 inyecciones cada 48 h de oxitetraciclina a una dosis de 10 ml/100 kg durante la fase aguda de la enfermedad resultó beneficiosa (Franc y Cardiegues, 1999).

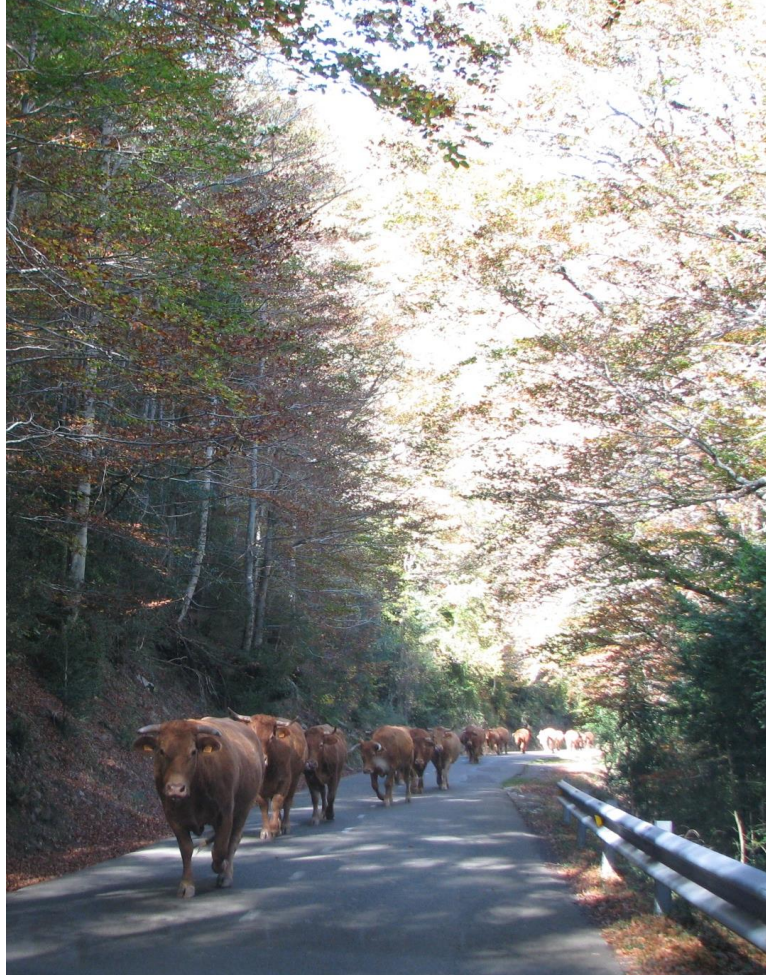
Los tratamientos *in vivo* también han sido estudiados en animales de experimentación (conejos y gerbos) durante la fase febril de la enfermedad. Pols (1960) investigó la eficacia de diferentes fármacos (formalina, pentamidinas, sulfamidas, trimetoprim, pirimetamina y oxitetraciclinas, entre otras) en conejos, sin obtener resultados satisfactorios. Por el contrario, Shkap et al. (1985) previno el desarrollo de orquitis en conejos inoculados simultáneamente con oxitetraciclina (30

mg/kg) por vía intramuscular y 10^6 taquizoítos de *B. besnoiti* por vía intraperitoneal. En el caso de los gerbos (*Meriones tristami*), la única droga efectiva fue la oxitetraciclina, capaz de reducir los signos clínicos de la fase aguda en 24-48 h tras la administración por vía intramuscular a una dosis de 200 mg/kg. Sin embargo, éste mismo compuesto no fue efectivo durante el ensayo *in vitro* (Shkap et al., 1987b).

Todas las experiencias terapéuticas frente a la besnoitiosis bovina se llevaron a cabo en la segunda mitad del siglo XX y hoy en día no hay ningún fármaco considerado eficaz frente a la infección por *B. besnoiti*.

Actualmente, el cribado de fármacos se lleva a cabo *in vitro* antes de ser probado *in vivo*. En este sentido, los estudios realizados hasta el momento han arrojado resultados prometedores utilizando varios fármacos de nueva generación como tiazolidas y arilimidamidas (Cortés et al., 2007a; 2011). No obstante, son necesarios nuevos estudios que sean capaces de identificar nuevos fármacos, posibles dianas terapéuticas, así como desarrollar un modelo de la infección en el ganado bovino que permita evaluar la eficacia de los mismos.

CAPÍTULO III: JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



La besnoitiosis bovina es una enfermedad parasitaria crónica y debilitante, producida por el protozoo apicomplejo *Besnoitia besnoiti*, que compromete las producciones y el bienestar animal dando lugar a infertilidad y esterilidad en los machos, lesiones cutáneas, deterioro de la condición corporal así como abortos y muertes ocasionales (Álvarez-García et al., 2013). No existen tratamientos ni vacunas eficaces actualmente en el mercado, por lo que el control se basa en un diagnóstico certero y precoz junto con la implantación de unas adecuadas medidas de manejo (Álvarez-García et al., 2013). En Europa, la besnoitiosis bovina estaba restringida, inicialmente, a dos regiones: los Pirineos y la región del Alentejo, en Portugal (Besnoit y Robin, 1912; Franco y Borges, 1915). Sin embargo, desde el año 2010, la enfermedad está considerada como re-emergente debido al incremento en el número de casos y a su expansión geográfica (EFSA, 2010). Si bien las claves de esta re-emergencia no se conocen con exactitud, el creciente movimiento intracomunitario de bovinos sin control sanitario previo de esta parasitosis podría estar favoreciendo su diseminación. Hoy en día podemos diferenciar tres posibles escenarios: (i) regiones donde la enfermedad es considerada endémica (EFSA, 2010); (ii) regiones donde la enfermedad está presente en forma de brotes epidémicos, principalmente originados tras la introducción de animales infectados sin control sanitario previo (Basso et al., 2013); y (iii) regiones libres donde aún no se ha descrito la enfermedad. Desafortunadamente, son pocos los estudios de prevalencia e incidencia realizados en Europa que permitan establecer cuál es la situación e importancia real de la enfermedad. Además, no se han llevado a cabo todavía estudios de impacto económico que valoren el efecto de la enfermedad sobre los parámetros productivos y reproductivos (Álvarez-García et al., 2013). Por otro lado, aún quedan por esclarecer otras cuestiones relacionadas con la epidemiología de la enfermedad como los modos de transmisión, el ciclo biológico y el papel de los rumiantes silvestres como posibles reservorios del parásito (EFSA, 2010).

En España, la besnoitiosis bovina está considerada como una enfermedad tradicionalmente endémica en los Pirineos y en la Sierra de Urbasa-Andía en Navarra (EFSA, 2010), donde se han descrito casos de la enfermedad desde los años 90 (Juste et al., 1990; Irigoien et al., 2000; Zacarías, 2009). Además, en el único estudio transversal de prevalencia realizado hasta la fecha, se describió una seroprevalencia individual del 16% (67/340) en el ganado de carne frente a un 0% (2/372) en el ganado de leche de la Comunidad Foral de Navarra, los animales seropositivos se localizaron, exclusivamente, en la Sierra de Urbasa-Andía y en el Pirineo (Álvarez-García et al., 2014b). Asimismo, en otras regiones de la mitad norte de España donde la enfermedad está presente, como la zona del Maestrazgo (Teruel), Zaragoza, País Vasco, Cataluña, Castilla y León, La Rioja, Comunidad Valenciana y la zona norte de Guadalajara, en Castilla-La Mancha la enfermedad podría considerarse también como endémica, ya que se describen frecuentemente casos nuevos de la enfermedad (Juste et al., 1990; Castillo, 2009; Fernández-García et al., 2010; datos no

publicados). Cabe señalar, además, que la mayoría de las descripciones de la enfermedad en España se han realizado en el ganado de carne. Esto se debe a que la infección por *B. besnoiti* se asocia a diversos factores de riesgo estrechamente relacionados con las medidas de manejo que se emplean, generalmente, en el manejo de este tipo de ganado en extensivo (monta natural, pastos comunales, etc.) (Álvarez-García et al., 2013). Sin embargo, quedan por esclarecer diversos aspectos epidemiológicos. Por ello, siguiendo las recomendaciones de la EFSA (2010), en la presente Tesis Doctoral se ha estudiado la epidemiología de la besnoitiosis bovina en España, centrándonos en el ganado bovino de carne, así como en otras especies de rumiantes silvestres y pequeños rumiantes domésticos, que podrían actuar como reservorios de la enfermedad.

En el primer objetivo se determinó la prevalencia y se estudió la dinámica de la besnoitiosis bovina en zonas donde la enfermedad es considerada tradicionalmente como endémica (los Pirineos y la Sierra de Urbasa-Andía).

Posteriormente, en el segundo objetivo, los estudios se enfocaron en especies de rumiantes silvestres y pequeños rumiantes domésticos que comparten el mismo hábitat que el ganado bovino de carne. Se seleccionaron todas las especies de rumiantes silvestres presentes en España a excepción del arruí, especie cinegética introducida en España en 1970 y circunscrita actualmente al sureste de la Península Ibérica (Santiago-Moreno y López-Sebastián, 2010). El resto de las especies (la cabra montesa, el rebeco, el muflón, el ciervo, el gamo y el corzo) están distribuidas por todo el país en parques nacionales, regionales y reservas abiertas o cerradas de caza. Actualmente, se desconoce si *B. besnoiti* puede infectar a estas especies, a pesar de que la besnoitiosis ha sido ya descrita en rumiantes silvestres (p. ej. reno) de regiones sub-árticas de Europa (Olias et al., 2011). Por otra parte, desde mediados del siglo XX, la población de rumiantes silvestres se encuentra en expansión en Europa (Gortázar et al., 2000; Apollonio et al., 2010), por lo que un incremento en la densidad de estas especies podría haber favorecido la diseminación de la enfermedad. En cuanto a los pequeños rumiantes domésticos, los países de la cuenca mediterránea como España, Francia, Italia y Grecia concentran los mayores censos de ganado ovino y caprino de Europa (www.magrama.es). En concreto, España ocupa el segundo lugar dentro de la Unión Europea en los censos de ambas especies. Mientras que la besnoitiosis caprina se ha descrito en Kenia, Irán y Nigeria, hasta el momento, no se ha descrito ningún caso de infección natural de besnoitiosis ovina (Oryan et al., 2014). Al igual que ocurre con los rumiantes silvestres, se desconoce la situación de la enfermedad en los pequeños rumiantes domésticos europeos, a pesar de que la besnoitiosis bovina está presente en varios países del centro y sur de Europa (Álvarez-García et al., 2013).

Por tanto, en el segundo objetivo, se estudió, en primer lugar, la posibilidad de adaptar las técnicas de diagnóstico serológico que se emplean en el ganado bovino a otras especies de rumiantes. Posteriormente, se estudió el papel que juegan las diferentes especies de rumiantes

silvestres en la epidemiología de la besnoitiosis bovina en aquellas zonas donde comparten hábitat con el ganado bovino en extensivo mediante el empleo de técnicas serológicas y moleculares, identificándose la especie de *Besnoitia* spp. que circula entre las especies de rumiantes silvestres en España. Además, se describió el primer caso de besnoitiosis sistémica en un corzo. Finalmente, se realizó el primer estudio de seroprevalencia de la infección por *Besnoitia* spp. en ovejas y cabras procedentes de zonas de España donde la besnoitiosis bovina es endémica.

En función de lo anteriormente expuesto, se plantearon 2 objetivos específicos que incluyeron 2 y 5 sub-objetivos cada uno:

❖ **OBJETIVO 1**

ESTUDIO DE LA SITUACIÓN ACTUAL DE LA BESNOITIOSIS BOVINA EN ESPAÑA EN ZONAS DONDE LA ENFERMEDAD ES ENDÉMICA.

- ❖ **Sub-objetivo 1.1: Prevalencia de la infección por *Besnoitia besnoiti* en el ganado bovino de carne de los Pirineos.**

Prevalence of *Besnoitia besnoiti* infection in beef cattle from the Spanish Pyrenees.

Se analizaron por primera vez un total de 3318 animales (hembras=3211; machos=107) procedentes de 63 rebaños y se estimaron las prevalencias individual, intra-rebaño y de rebaño de la infección por *B. besnoiti* en el ganado bovino de carne procedente del Pirineo Central. Además, se determinó la prevalencia individual de todos los sementales de aptitud cárnica ($n=587$) de la zona muestreada y se evaluaron el sexo y la edad como factores de riesgo individuales para la infección por *B. besnoiti*.

- ❖ **Sub-objetivo 1.2: Dinámica de la infección por *Besnoitia besnoiti* en granjas donde la enfermedad es endémica.**

Clinical and serological dynamics of *Besnoitia besnoiti* infection in three endemically infected beef cattle herds.

Se estudió la dinámica de la infección por *B. besnoiti* en una zona de España donde la enfermedad es endémica. Para ello, se seleccionaron 3 granjas de aptitud cárnica con un historial previo de

besnoitiosis localizadas en la Sierra de Urbasa-Andía (Navarra) en las que se realizó un seguimiento clínico y serológico durante un periodo de 4 años. Se estimaron las prevalencias clínica y serológica así como la incidencia de la infección o enfermedad. Además, por primera vez se estudió la presencia de parasitemia en animales crónicamente infectados.

❖ **OBJETIVO 2**

ESTUDIO DE LA INFECCIÓN POR *BESNOITIA* SPP. EN OTRAS ESPECIES DE RUMIANTES QUE PUEDEN ACTUAR COMO RESERVORIOS U HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS DE *B. BESNOITI*.

- ❖ **Sub-objetivo 2.1: Adaptación de técnicas serológicas empleadas en el ganado bovino para el diagnóstico de la besnoitiosis en rumiantes silvestres.**

Serological evidence of Besnoitia spp. infection in Canadian wild ruminants and strong cross-reaction between Besnoitia besnoiti and B. tarandi.

Se evaluó el uso de las pruebas serológicas IFI y Western blot empleadas en el diagnóstico de la infección por *B. besnoiti* en el ganado bovino para la detección de la infección por *Besnoitia* spp. en rumiantes silvestres. Para ello, se determinó el grado de reacción cruzada existente entre *B. besnoiti* y *B. tarandi* utilizándose como sueros testigo sueros de diferentes especies de rumiantes silvestres y ganado bovino seropositivos procedentes de Canadá y España, respectivamente, así como sueros hiperinmunes obtenidos en conejos frente a ambas especies.

- ❖ **Sub-objetivo 2.2: Primer estudio serológico de la infección por *Besnoitia* spp. en rumiantes silvestres de Europa.**

First serosurvey of Besnoitia spp. infection in European wild ruminants.

En primer lugar, se adaptó la prueba ELISA para el diagnóstico de la infección por *Besnoitia* spp. en especies de rumiantes pertenecientes a la Familia y Subfamilia Cervidae y Caprinae, respectivamente. Posteriormente, se determinó la seroprevalencia de la infección por *Besnoitia* spp. en diferentes especies de rumiantes silvestres (ciervo, corzo, muflón y rebeco) con el fin esclarecer su papel como posibles reservorios u hospedadores intermediarios de *B. besnoiti*. Para ello, se muestrearon diversas zonas de España en las cuales estas especies compartiesen hábitat

con el ganado bovino. Se utilizó, en primer lugar, la prueba ELISA como técnica de cribado serológico y, posteriormente, el Western blot como técnica confirmatoria.

- ❖ **Sub-objetivo 2.3: Estudio de la infección por *Besnoitia* spp. y detección del parásito en rumiantes silvestres de zonas donde la besnoitiosis bovina está presente.**

The role of wild ruminants as reservoirs of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle.

Se llevó a cabo un amplio estudio serológico de la infección por *Besnoitia* spp. en rumiantes silvestres (cabra montesa, ciervo, corzo, gamo, muflón y rebeco) procedentes exclusivamente de regiones de España donde se ha detectado la presencia de *B. besnoiti*. Se seleccionaron, por un lado, zonas donde la besnoitiosis bovina es endémica (los Pirineos y el Maestrazgo, Teruel) y, por otro lado, zonas donde se han descrito recientemente brotes de la enfermedad (Extremadura y Andalucía). Se utilizó, en primer lugar, la prueba ELISA como técnica de cribado serológico y, posteriormente, el Western blot como técnica confirmatoria. Además, la presencia del parásito fue confirmada mediante PCR en un ciervo seropositivo y se realizó un genotipado mediante el análisis de microsatélites para identificar la especie de *Besnoitia* implicada.

- ❖ **Sub-objetivo 2.4: Descripción de un caso de besnotiosis sistémica en un corzo *Capreolus capreolus*.**

Systemic besnoitiosis in a juvenile roe deer (*Capreolus capreolus*).

Se describió por primera vez un caso de besnoitiosis sistémica en un corzo macho de 6 a 8 meses de edad hallado muerto en la zona del Maestrazgo, Teruel. En primer lugar, se realizó una necropsia completa y se estudiaron las lesiones macroscópicas. A continuación, se recogió un elevado número de tejidos en los que se estudiaron las lesiones microscópicas y la distribución intra-orgánica del parásito mediante histología y PCR, respectivamente. Finalmente, se llevó a cabo el genotipado de la especie de *Besnoitia* mediante el análisis de microsatélites y se estudió, por primera vez, la utilidad del gen de *Besnoitia* que codifica la PDI (BbPDI) como posible marcador genético para discriminar entre las especies *B. besnoiti* y *B. tarandi*.

- ❖ **Sub-objetivo 2.5:** Primer estudio de la infección por *Besnoitia* spp. en pequeños rumiantes domésticos de España.

Absence of serological evidence for Besnoitia spp. infection in small domestic ruminants in Spain.

El objetivo de este trabajo fue estudiar, por primera vez, la presencia de anticuerpos específicos frente a la infección por *Besnoitia* spp. en ovejas y cabras procedente de España. Para ello, se analizaron cabras ($n=311$) y ovejas ($n=320$) ubicadas en una región donde la besnoitiosis bovina es endémica (los Pirineos) y ovejas ($n=198$) localizadas en una región del centro del país donde la enfermedad puede considerarse como endémica ya que los primeros casos de la enfermedad se registraron en el año 2003 en el ganado bovino que convive en estrecho contacto con el ganado ovino (Cantaloja, Guadalajara). Se utilizó en primer lugar la prueba ELISA y, posteriormente, el Western blot como técnica confirmatoria. Además, se llevó a cabo una exhaustiva inspección clínica en las ovejas muestreadas procedentes de Cantaloja.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS (Publicaciones)



OBJETIVO 1. ESTUDIO DE LA SITUACIÓN ACTUAL DE LA BESNOITIOSIS BOVINA EN ESPAÑA EN ZONAS DONDE LA ENFERMEDAD ES ENDÉMICA

Resumen

Siguiendo las recomendaciones de la EFSA, se realizaron estudios de prevalencia (sub-objetivo 1.1) y dinámica de la infección (sub-objetivo 1.2) en el ganado bovino de carne procedente del Pirineo Central y la Sierra de Urbasa-Andía (Navarra), respectivamente, para conocer la situación actual de la besnotiosis bovina en zonas donde ésta es considerada endémica. En el estudio de prevalencia realizado en ganado bovino de carne en extensivo se muestreó al menos el 50% del efectivo de 63 granjas, con un margen de error del 11,5% y la totalidad de los machos de la zona. En el estudio de la dinámica de la infección se seleccionaron 3 granjas donde la enfermedad es endémica, en las cuales se realizó un seguimiento clínico y serológico durante 4 años. El diagnóstico clínico fue llevado a cabo por veterinarios familiarizados con la enfermedad. El protocolo de diagnóstico serológico fue el mismo en ambos estudios. Se utilizó, en primer lugar, la prueba ELISA y, posteriormente, el Western blot como técnica confirmatoria para granjas con sólo uno o dos animales seropositivos en el estudio de prevalencia y para animales con valores de IRPC por debajo de 30 en el estudio de incidencia. Los resultados han puesto de manifiesto la elevada prevalencia e incidencia de la infección en zonas de España donde la enfermedad es endémica. En los Pirineos, el 87,3% de las granjas están infectadas con una seroprevalencia intra-rebaño que varía entre el 15,1 y el 95,6%, mientras que la seroprevalencia individual se encuentra en torno al 50% tanto en machos como en hembras. En la Sierra de Urbasa-Andía las prevalencias intra-rebaño clínica y serológica oscilan entre el 45,2% y el 79,2% y entre el 35,6% y el 86,50%, respectivamente, y en cuanto a las tasas anuales de incidencia clínica y serológica son del 20% y del 15%, respectivamente. Además, se detectó un 17% de animales con signos clínicos compatibles con la enfermedad (quistes tisulares en la conjuntiva ocular o en el vestíbulo vaginal) que, sin embargo, fueron seronegativos mediante IFI y Western blot.

En España, por lo tanto, cuando la enfermedad es endémica en una zona y no se establecen unas adecuadas medidas de control, los valores de prevalencia e incidencia se mantienen elevados a lo largo del tiempo. Sin embargo, los signos clínicos son leves y consisten, únicamente, en la presencia de quistes tisulares en conjuntiva ocular o vestíbulo vaginal. A la vista de los resultados obtenidos, se recomienda incluir a la besnoitiosis bovina en el programa sanitario de las explotaciones de vaca nodriza, no solo en las zonas endémicas de la enfermedad sino también en las áreas consideradas como libres. De hecho, la besnoitiosis bovina debería ser estudiada en otras regiones como el Alentejo, Macizo Central Francés y Los Apeninos centrándose en ganado de carne en extensivo y siguiendo un protocolo diagnóstico similar al utilizado en la presente Tesis Doctoral. Por último, se hacen necesarios estudios que cuantifiquen las pérdidas económicas

durante y después de un brote, así como en aquellas granjas donde la enfermedad es endémica para poder implantar un adecuado programa de control.

Sub-objetivo 1.1

Prevalencia de la infección por *Besnoitia besnoiti* en ganado bovino de carne de los Pirineos.





Contents lists available at [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)
The Veterinary Journal
www.elsevier.com/locate/tvj



Short Communication

Prevalence of *Besnoitia besnoiti* infection in beef cattle from the Spanish Pyrenees

Daniel Gutiérrez-Expósito^a, Adriana Esteban-Gil^b, Luis Miguel Ortega-Mora^a, Paula García-Lunar^a, Juan Antonio Castillo^b, Jose Miguel Marcén^b, Gema Álvarez-García^{a,*}

^a SALUVET, Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain

^b Animal Pathology Department, Faculty of Veterinary Sciences, University of Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain

Article history:

Accepted 9 February 2014

Keywords: *Besnoitia besnoiti*; beef cattle; prevalence; risk factors; Spanish Pyrenees

ABSTRACT

Reports of recent outbreaks of bovine besnoitiosis in Europe have emphasized the need for prevalence studies to determine the importance of the disease. A previous cross-sectional study carried out in a northern province of Spain showed that seropositive cattle were beef breeds primarily located in regions where the disease is endemic (such as in the Pyrenees). The present study focused on this population. Sixty-three beef herds were selected and at least 50% of the animals in each herd were sampled ($n=3318$). The herd, intra-herd and animal prevalence rates were calculated. All breeding bulls located in the same region were also sampled ($n=587$), and the animal prevalence calculated. Sera were tested by ELISA.

The herd prevalence rate of bovine besnoitiosis was 87.3%, and both sexes were similarly affected (approximately 50%). The results indicate that the disease is highly widespread in the Pyrenees, and that serological examination of cattle should be recommended when trading beef cattle.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Publicado en *Veterinary Journal*, 2014. 200 (3), 468-470.

Presentado en el XVIII Congreso ANEMBE, Lérida, España, 2013.

Presentado en el I Congreso Apicowplexa, Lisboa, Portugal, 2012.

Bovine besnoitiosis, caused by the apicomplexan protozoan parasite *Besnoitia besnoiti*, is a chronic and debilitating disease that may compromise cattle productivity by producing transient or persistent sterility in bulls as well as by reducing slaughter weight. The disease is widespread in Africa and Asia and has been recently recognized as a re-emergent cattle disease in Europe (European Food Safety Authority, 2010; Álvarez-García et al., 2013). However, many aspects related to the epidemiology remain unknown such as the prevalence and incidence of disease in areas where it is endemic (for example, the Pyrenees and Alentejo region of Portugal), as well as associated risk factors.

Besnoitiosis was first described in the cattle of the Pyrenees at the beginning of the 20th century (Besnoit and Robin, 1912). However, in the last two decades it has re-emerged as a disease of importance. In Spain, the disease was first reported in the northern regions of Navarra and Basque Country (Juste et al., 1990). A cross-sectional study recently performed in Navarra showed 16% seroprevalence in beef cattle as opposed to 0% in dairy cattle, where the majority of sampled animals were females. Moreover, seropositive beef

cattle were located in mountainous regions with previously reported cases of the disease (namely, the Urbasa-Andía mountains and the Pyrenees) (Álvarez-García et al., 2014b). Accordingly, for this study, our target area was a mountainous region that comprises approximately 25% of the Spanish Pyrenees located in the province of Huesca (Aragon, Spain) (Fig. 1). Throughout the Pyrenees, natural mating is used in beef herds. Beef cattle are usually kept indoors in autumn and winter, but during spring and summer months, mixed herds cohabit with wild ruminants (roe deer and red deer) in communal pastures and are exposed to blood-sucking arthropods (e.g. tabanids).

A cross-sectional study was performed in which herd was the initial sampling unit and the individual animal was the base unit following the requirements set up by Bartels et al. (2006): representation of the target area (485 beef herds; www.aragon.es), a minimum sample size, a convenient procedure for the selection of herds and sampling of all animals ≥ 1 year old in the herd (or at least 50% of the herd).

The required herd sample size was calculated to estimate herd prevalence with 95% confidence and an error margin of <10% using Win Episcope 2.0

(Thrusfield et al., 2001). A prevalence of 50% was assumed. Due to the availability of samples, 63 beef herds and 3318 animals (3211 females, 107 males) were sampled to comply with the acceptable error margin of 11.5%. The tested cattle were mostly of the Alpine Brown breed.

The herd prevalence (HP), intra-herd prevalence and true animal prevalence (TAP) adjusted to the test sensitivity (Se) and specificity (Sp) were calculated (Greiner and Gardner, 2000).

Subsequently, all breeding bulls ≥ 1 year old ($n=587$) from a total of 307 herds and located in the same region were sampled to estimate the TAP. Age was annotated and classified into four categories (1–3, 3–5, 5–7 and >7 years). The data were analyzed using chi-square or Fisher's exact test. Statistical analyses were performed using SPSS

14.0 (SPSS) and InStat 3.05 software (GraphPad).

The samples were analyzed using a previously standardized *in-house* ELISA (97.3% Se and 94.6% Sp). When there were only one or two positive animals in a herd, the samples were retested using a tachyzoite-based Western blot performed under non-reducing conditions in order to confirm the herd-test result (García-Lunar et al., 2013a).

The HP rate was 87.3% (55/63) and there were only three herds with a single positive reaction, all of which proved to be negative by Western blot. Intra-herd prevalence ranged between 15.1% and 95.7% and TAP was 52.3% (95% CI: 50–53%) and 49.2% (95% CI: 45–52%) in females and males, respectively ($P = 0.05$). Most seropositive cattle showed moderate-high antibody levels (Fig. 2).

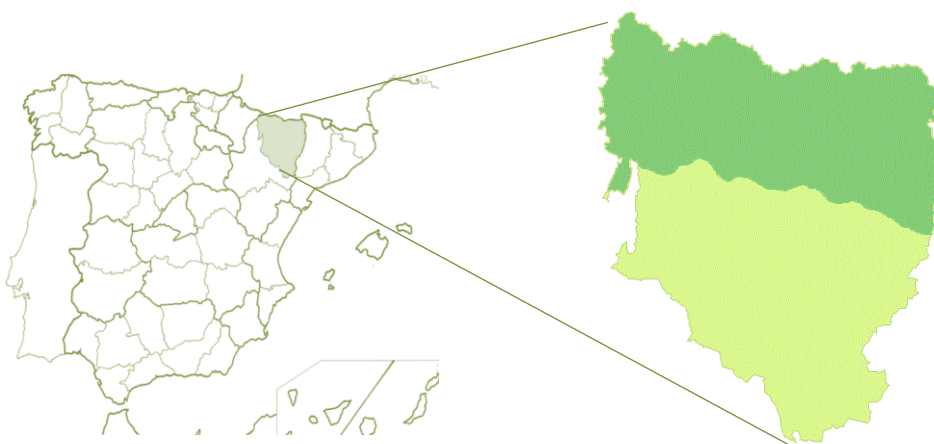


Fig. 1. Origin of tested sera. The Spanish Pyrenees cattle sampled are shown in black. Sera were collected during the annual official eradication and control programs for brucellosis by the veterinarians of the Department of Agriculture of Aragon.

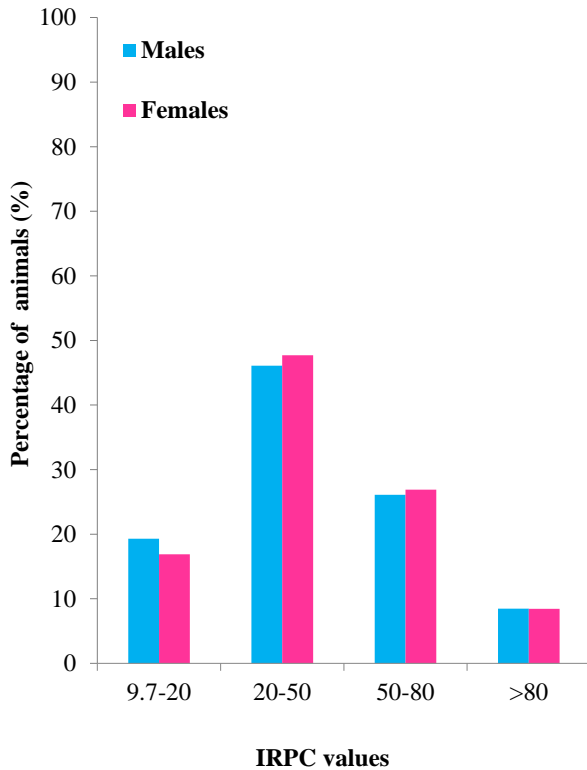


Fig. 2. Specific antibody levels distribution of seropositive animals. RIPC (OD_{405} sample – OD_{405} negative control) / (OD_{405} positive control – OD_{405} negative control) $\times 100$. Samples with RIPC ≥ 9.7 were considered positive.

Management measures play a key role in the entrance and dissemination of bovine besnoitiosis in a herd because direct contact is thought to be the primary route of parasite transmission. Horizontal transmission was supported by the finding that older cattle had a higher probability of testing seropositive ($P < 0.001$, χ^2) (Fig. 3). This finding is consistent with previous studies (European Food Safety Authority, 2010).

These data suggest that bovine

besnoitiosis is likely to have a significant economic impact on beef cattle farms in the Pyrenees. Unfortunately, the lack of efficient treatments and vaccines against bovine besnoitiosis together with the existence of several risk factors associated with extensive management conditions in mountainous areas render it difficult to establish effective control measures. Furthermore, culling of seropositive cattle in affected herds is unlikely to be feasible due to the high intra-herd prevalence rates reported here and in previously reported disease outbreaks (Fernández-García et al., 2010).

An additional problem is that beef bulls are the primary focus of national and international animal trade in Europe. This means that there is a significant risk of the introduction of a naïve bull into an infected herd, which may lead to fertility problems. The introduction of a seropositive bull into a naïve herd is also a difficulty as it may produce subclinical carriers which can then act as reservoirs in a herd (Frey et al., 2013).

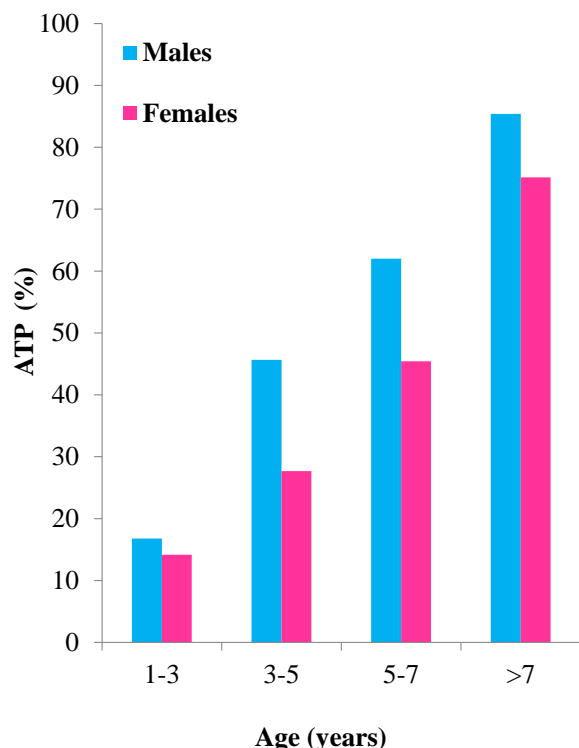


Fig. 3. Age distribution of seropositive animals.

Thus, in besnoitiosis-free herds, all new entries to a herd should be tested, particularly when animals come from areas where the disease is endemic.

Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a

financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgements

This work was supported by a research project from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (AGL 2010-20561). Daniel Gutiérrez Expósito has been financially supported by the Ministry of Economy and Competitiveness (grant BES-2011-043753). We thank DGA for kindly providing serum samples. We wish to acknowledge Vanesa Navarro Lozano and Alicia García Culebras for their excellent technical assistance. Preliminary results were presented at the First International Meeting on Apicomplexa Parasites in Farm Animals, Lisbon 25th–28th, October 2012.

Sub-objetivo 1.2

Dinámica de la infección por *Besnoitia besnoiti* en granjas donde la enfermedad es endémica.



ORIGINAL ARTICLE

Clinical and serological dynamics of *Besnoitia besnoiti* infection in three endemically infected beef cattle herds

D. Gutiérrez-Expósito¹, L.M. Ortega-Mora¹, P. García-Lunar¹, S. Rojo-Montejo¹, J. Zabala², M. Serrano² and G. Álvarez-García^{1*}

¹SALUVET, Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

²Albaikide, S.A. Veterinary Services, Navarra, Spain

Keywords:

Besnoitia besnoiti
Longitudinal study
Beef cattle
Endemic infection
Clinical signs
Serology

*Correspondence:

G. Álvarez-García
SALUVET, Animal
Health Department,
Faculty of Veterinary
Sciences,
Complutense
University of Madrid,
Ciudad Universitaria
s/n, 28040-Madrid,
Spain.
Tel.:
+34-913944095; Fax:
+34-913944098;
E-mail:
gemaga@vet.ucm.es

The experimental
design and the
analysis of data were
headed by SALUVET-
Madrid.

Received for
publication
March 31, 2015.
doi:10.1111/tbed.12402

Summary

The dynamics of bovine besnoitiosis were studied in an area where the disease is endemic. A four-year longitudinal study was conducted for the first time in three infected beef cattle herds located in the Urbasa-Andía Mountains (Navarra, Spain). Each herd was visited four to seven times, and clinical and serological prevalence rates and incidence rates were estimated. Clinical inspections to identify compatible clinical signs with the disease stages were conducted at the beginning and end of the study. Serological assessment was initially performed by ELISA. Seronegative animals with clinical signs and seropositive animals with relative index per cent (RIPC) values lower than 30 that did not increase during the study period were analysed by Western blot to optimize the sensitivity and specificity of the ELISA test. Clinical prevalence rates were slightly higher (62% on average) than the seroprevalence rates (50% on average), and tissue cysts located in the vestibulum vaginae and sclera were the most frequently detected clinical signs. The proportion of seropositive animals with clinical signs varied from 16.7% to 73.6% among the herds, and 17% of cattle with clinical signs proved to be seronegative by both serological tests. An average 22% serological incidence rate was also reported in addition to clinical incidence rates that varied from 12.5% to 16.7%. Additionally, parasitemia was investigated in the herd that showed the highest clinical and seroprevalence rates. Only one PCR positive blood sample was detected. Thus, the role that blood may play in parasite transmission needs to be further investigated. Infected herds maintained both high prevalence and incidence rates in the absence of control measures and a high number of parasite carriers. Finally, economic impact studies on reproductive and productive losses associated with besnoitiosis need to be performed to implement a cost-benefit control programme.

Publicado en *Transboundary and Emerging Diseases*, 2015 (doi:10.1111/tbed.12402).

Presentado en el XIX Congreso ANEMBE, Oviedo, España, 2014.

Presentado en el XXV Congreso WAAVP, Liverpool, UK, 2015.

1. Introduction

Bovine besnoitiosis is a parasitic disease caused by the apicomplexan protozoan parasite *Besnoitia besnoiti* that may compromise cattle productivity due to transient or definitive sterility in bulls, skin lesions, poor body condition and occasional abortions (Álvarez-García et al., 2013). The disease has an acute anasarca stage that is primarily characterized by fever, enlarged lymph nodes and oedemas (which may go unnoticed). This stage is followed by a chronic scleroderma stage that is primarily characterized by cutaneous lesions (alopecia and hyperkeratosis) that occur due to the presence of pathognomonic tissue cysts in the subcutaneous tissues that are visible in the sclera conjunctiva and mucous membranes (such as the *vestibulum vaginae*) (Jacquet et al., 2010; Álvarez-García et al., 2014a).

In herds where the disease is endemic, few animals show clinical signs; indeed, most animals develop a specific antibody response without apparent clinical signs (Álvarez-García et al., 2013). However, these subclinically infected animals may serve as parasite carriers (Frey et al., 2013) and may be responsible for the spread of the infection due to animal trade from endemic to *Besnoitia*-free regions. Currently, bovine besnoitiosis is considered to be endemic in Africa (sub-Saharan countries),

Asia (Israel) and some restricted regions of south-western Europe (e.g. the Pyrenees and the Alentejo region of Portugal). Moreover, it is also considered to be a re-emergent disease in southwestern Europe, where numerous outbreaks have been reported in France, Portugal, Spain, Germany and Italy (EFSA Journal, 2010; Rostaher et al., 2010; Fernández-García et al., 2010; Gentile et al., 2012). Recent reports of the disease imply that the disease is spreading to other neighbouring countries, such as Switzerland, Croatia and Hungary (Basso et al., 2013; Beck et al., 2013; Hornok et al., 2014). Unfortunately, scarce data are available concerning infection dynamics in naturally infected herds worldwide. In the past, 50% seroprevalence rates together with clinical prevalence rates that varied from 2.1% to 49.7% were reported in South Africa and Israel (Bigalke, 1968; Goldman and Pipano, 1983; Chatikobo et al., 2013; Sambo et al., 2014). Moreover, clinical prevalence rates of 1–10% have been reported in the French Pyrenees (Legrand, 2003). However, it is difficult to compare these studies due to differences in the serological techniques and clinical inspection procedures employed.

Furthermore, the dynamics of the disease have been poorly studied. The data available are restricted to two herds from Portugal and France that were followed for 14

and 18 months, respectively, and showed a significant increase in seroprevalence (Cortés et al., 2006a; Liénard et al., 2011). In Spain, recent studies have shown that most seropositive animals are restricted to beef cattle in traditional mountain systems where the disease was previously described (Álvarez-García et al., 2014b). For example, a herd prevalence rate of 87% was reported in the Pyrenees (Gutiérrez-Expósito et al., 2014). However, the disease is currently spreading to *Besnoitia*-free extensive outdoor grazing systems in the mountainous areas as well as extensive semi-natural silvopastoral woodlands known as 'dehesas' throughout the country (Fernández-García et al., 2010, G. Álvarez-García, unpublished results).

In this context, the aim of this work was to improve the knowledge on bovine besnoitiosis by studying the dynamics of the disease (i.e. clinical signs and specific antibody levels) in infected herds located in a region where the disease is endemic. Thus, a four-year longitudinal study was conducted in three infected beef cattle herds, and clinical and serological prevalence and incidence rates were estimated (Vandenbroucke et al., 2007). Additionally, we looked for parasitemia in the most affected herd in an attempt to study whether the blood from these infected animals might be a relevant source of parasite for blood-sucking arthropods.

2. Material and methods

2.1. Experimental design, sampling and data

The study was conducted in a region where bovine besnoitiosis is traditionally endemic (Urbasa-Andía mountains; Navarra, Northern Spain). In Navarra, a 16% animal seroprevalence rate was reported in beef cattle versus 0% in dairy cattle; the seropositive animals were located in the Urbasa-Andía Mountains and the Pyrenees (Juste et al., 1990; Álvarez-García et al., 2014b). In this region, cattle are usually kept indoors in late autumn and winter, whereas herds share communal pastures, have contact with wild ruminants and are exposed to blood-sucking arthropods during late spring and summer.

Three beef cattle herds with a previous history of bovine besnoitiosis were selected and followed for up to 4 years (2009–2013). The disease was firstly diagnosed in 2003, 1996 and 2001 in herds A, B and C, respectively. Moreover, the disease has been widely distributed in the past in this region (Juste et al., 1990; Irigoien et al., 2000). The herd size slightly varied throughout the study period due to new entries and culling (herd A: $n=53-67$; herd B: $n=24-37$; herd C: $n=37-48$). Their ages varied from 1 to 17 years, and the average age of herds A, B and C was 9, 4.9 and 5.6 years old, respectively. Herd A practices

natural mating, whereas herds B and C have been using artificial insemination since 2007. Herd A had a 6-year-old breeding bull in 2009 and introduced a 1-year-old breeding bull in 2011. New entries in herd A (replacement heifers) came from a neighbouring herd where bovine besnoitiosis has been also diagnosed, although the serostatus and clinical inspection before purchase were unknown. In contrast, herds B and C maintain their own replacements as future suckler cows. Culling performed throughout the study did not form part of any herd health scheme.

All animals older than one year were sampled and clinically inspected when they were kept indoors. The number of visits varied from 4 to 7 with at least one annual visit when sera were collected (Table 1). Clinical inspections were carried out at the beginning and the end of the study. Age and sex data were annotated. Clinician veterinarians who have been recording cases of the disease in this region for more than 20 years did clinical inspections. Clinical signs compatible with the disease that were extensively described by Álvarez-García et al. (2014a) were annotated. Specifically, cattle exhibiting oedema, nasal discharge and apathy were considered to be acutely infected, whereas cattle with skin lesions, such as hyperkeratosis, alopecia and scars or nodules in the udders and cysts that were visible by the naked eye in the sclera or eyelid conjunctiva or

mucous membranes, were considered to be chronically infected. Sclera conjunctiva cysts (SCC) are considered pathognomonic of chronic bovine besnoitiosis (Bigalke and Naude, 1962). Diseases included in the differential diagnosis of bovine besnoitiosis, such as mange and dermatophytosis, were discarded. Blood samples were collected by coccygeal venipuncture and centrifuged at 290 g for 15 min at 4°C. Sera were frozen at -20°C until tested by ELISA. To avoid false seronegative (Fernández-García et al., 2010; Schares et al., 2011a) and false seropositive results (Nasir et al., 2012; Uzeda et al., 2014), seronegative animals with clinical signs and seropositive animals with RIPC (relative index per cent) values under 30 that did not increase during the study period were further tested by Western blot (García-Lunar et al., 2013a). Moreover, an extra tube with heparin was collected from each animal from herd A on the last 3 visits to detect parasitemia by PCR.

2.2. Serology

The protocol for the indirect SALUVET *in-house* ELISA based on tachyzoite soluble extracts and the selection of the positive and negative controls were described previously by Fernández-García et al. (2010). The cut-off value employed was $RIPC \geq 9.7$ for 97.3% sensitivity (Se) and 94.6% specificity (Sp) (García-Lunar et al., 2013a). The tachyzoite-

based Western blot was performed under non-reducing conditions following a previously described procedure. Sera in which at least three bands in two of the three antigenic reactivity areas were detected were considered to be positive (García-Lunar et al., 2013a).

2.3. Parasitemia detection

Whole blood in a heparin tube was used to obtain white blood cells. Briefly, an aliquot of 500 µl of blood was gently mixed for 5 min with 600 µl of cold lysing solution [4.5 ml of 0.83% NH₄Cl (Panreac®), 5 ml of 2.06% Tris (Panreac®), pH 7.65 and 490.5 ml of Millipore water, pH 7.2] at room temperature. After centrifugation for 30 s at 12 000 *g*, the supernatant was decanted and the process was repeated until the liquid was clear red in colour. Nucleic acid extraction from the white blood cells was performed using the Maxwell®16 FFPE Tissue LEV (Low- Elution Volume) DNA Purification Kit according to the manufacturers instructions (Promega Corporation, Madison, WI, USA). PCR for *B. besnoiti* amplification was performed as described by Cortés et al. (2007b). The target DNA sequence amplified was the ITS₁ (internal transcribed spacer) region, and the amplification product had an expected size of 231 base pairs.

Table 1: Prevalence of *B. besnoiti* infection (95% CI).

	Sampling							
	Winter 2009	Spring 2010	Winter 2010	Spring 2011	Winter 2012	Spring 2013	Winter 2013	
Herd A	Seroprevalence (%)	86.50 (77.6-95.3)	81.87 (72.8-90.9)	84.49 (75.7-93.3)	73.56 (63.5-83.6)	45.99 (35.0-56.9)	45.15 (34.1-56.2)	56.55 (45.1-67.9)
	Clinical prevalence (%)	79.24	ND	ND	ND	ND	ND	60.65
Herd B	Seroprevalence (%)	55.1 (37.2-72.9)	62.13 (44.3-79.9)			41.17 (26.5-55.8)		50.00 (35.2-64.8)
	Clinical prevalence (%)	68.0	ND	ND	ND	ND	ND	59.4
Herd C	Seroprevalence (%)	49.68 (36.5-62.8)	55.33 (42.4-68.2)		52.93 (38.2-67.7)	49.73 (36.3-63.1)		35.58 (22.1-49.1)
	Clinical prevalence (%)	59.6	ND	ND	ND	ND	ND	45.2

2.4. Data analysis

Clinical and serological prevalence rates were calculated as the number of positive animals divided by the total number of sampled animals within a herd. The seroprevalence rates were corrected using the Rogan–Gladen estimation according to the values of Sp and Se for the ELISA employed (Greiner and Gardner, 2000). Sex data were not evaluated because only two males were exclusively present in herd A.

The serological and clinical incidence of *B. besnoiti* infection per 100 animal-years of observation was estimated based on the number of new clinical cases or seroconversions and the total of animal years for follow up. To estimate animal-years of observation, animals were included from the time of their first negative clinical inspection or negative serologic test result until their first positive result (Vandenbroucke et al., 2007).

3. Results

3.1. Prevalence

Clinical prevalence rates were slightly higher than the sero- prevalence rates in most of the samplings (Table 1). Scars in the udders were detected only in 2009 in herds A (49%; 26/53) and B (8%; 2/25), and all these animals were seropositive. Moreover, 17 of 28 animals with scars also showed SCC and cysts in vestibulum

vaginae. Skin lesions (alopecia) were observed in two seropositive animals (one from herd A and one from herd B) in 2009. However, mild clinical signs consisting of visible tissue cysts in the sclera conjunctiva ($n=34$), mucous membranes of the *vestibulum vaginae* ($n=55$) and both locations simultaneously ($n=79$) were detected after 265 clinical inspections of 191 animals on both visits. The most prevalent clinical sign was the presence of cysts in the vestibulum vaginae (Fig. 1). However, the number of detectable cysts in the sclera conjunctiva and *vestibulum vaginae* was generally under 20 (G. Álvarez-García, unpublished results). Curiously, for 4 years, the veterinarians detected 14 and 7 unconfirmed cases of compatible *B. besnoiti* acutely infected cattle in herds A and B, respectively. These animals showed with hyperthermia, oedema and apathy, during their regular visits between the programmed samplings. Remarkably, 5 of 14 clinical cases in herd A correspond to animals under 1 year which died within a few days. All herds showed high seroprevalence rates [herd A (45.1–86.5%); herd B (41.7–62.1%); herd C (35.6–55.3%)] throughout the study period. The seroprevalence rates in herd A remained constant from 2009 to 2011 and decreased over the following 2 years. Herd B showed a slight decrease in seroprevalence in 2012. However, the seroprevalence rate in 2009 did not vary from that in 2013. The seroprevalence rates in herd C did not vary

during the study period with the exception of the last sampling (Table 1). The percentages of seropositive animals with clinical signs varied from 16.7% to 73.6%, with the highest and lowest percentages found in herds A and C, respectively. Nevertheless, seropositive animals without clinical signs were also detected in herd A (n = 12; 10.5%), herd B (n = 10; 16.1%) and herd C (n = 15; 16.9%). Moreover, 31 of 34 seropositive animals with RIPC values under 30 were

confirmed by Western blot (Fig. 2). In contrast, 63 seronegative animals by ELISA showed clinical signs (only tissue cysts), and the presence of specific antibodies in 30 (47.6%) was later confirmed by Western blot (Fig. 2). Nine of 30 seropositive cattle showed tissue cysts in both locations and 4 and 17 showed only SCC and *vestibulum vaginae* cysts, respectively.

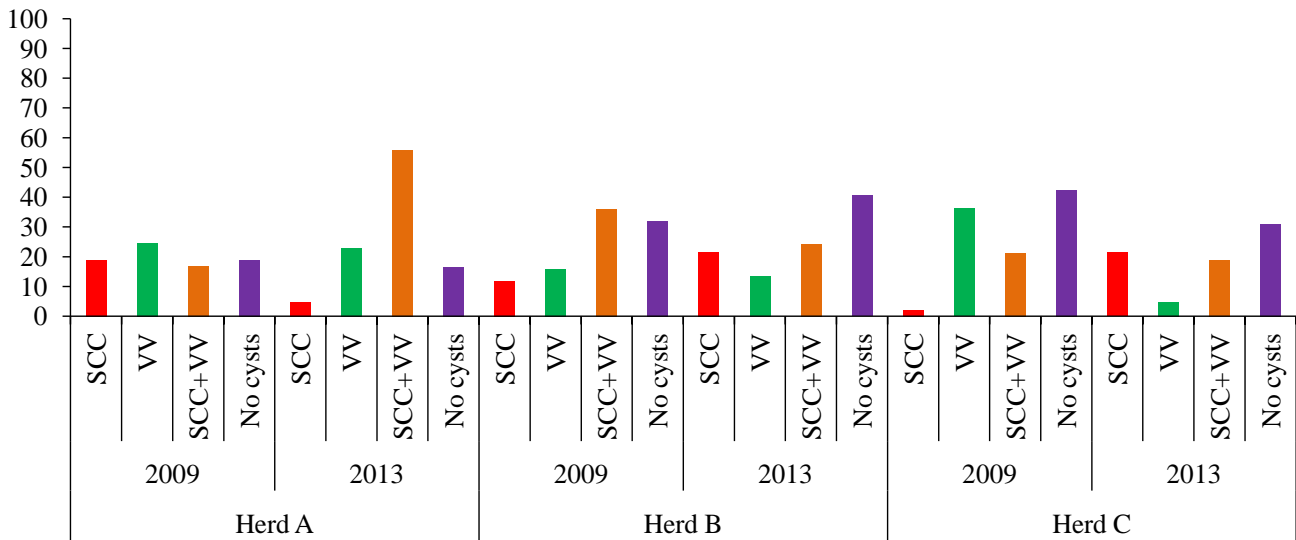


Fig. 1. Detection of *Besnoitia besnoiti* tissue cysts. SCC: scleral conjunctiva cysts. VV: *vestibulum vaginae*.

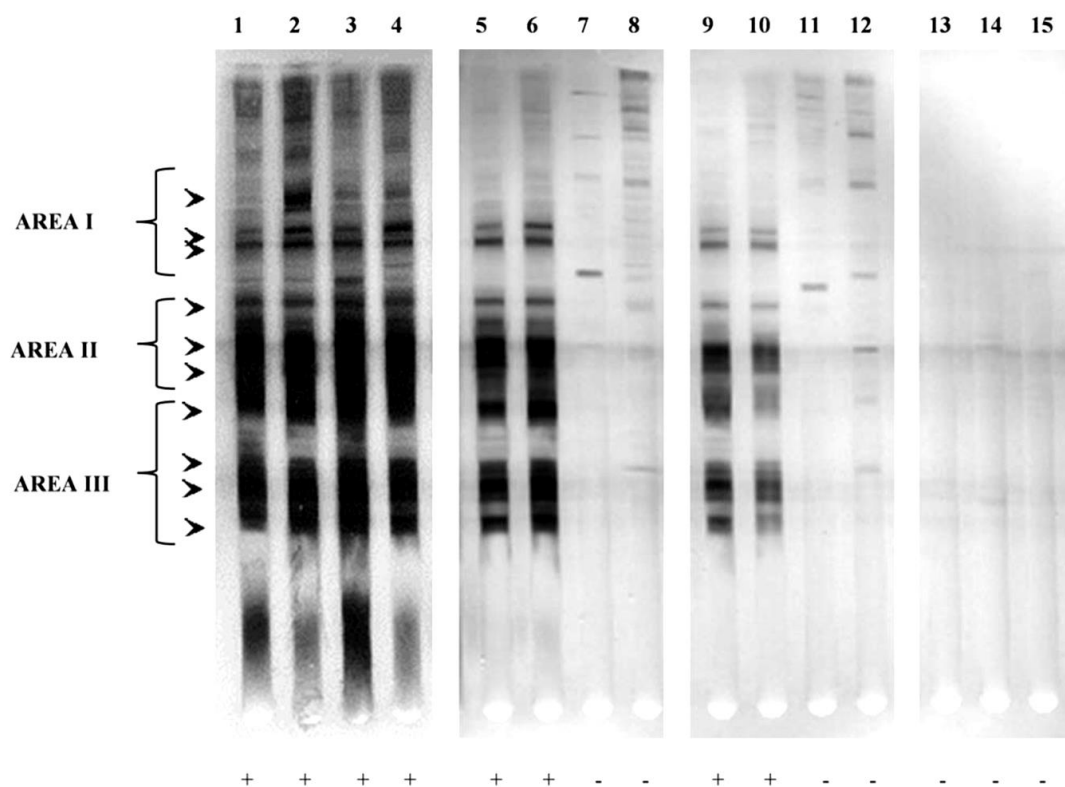


Fig. 2. Western blot analysis of ELISA positive and negative samples. Lines 1–4: seropositive animals with clinical signs. Lines 5–8: seropositive animals with RIPC values under 30. Lines 9–12: seronegative animals with clinical signs. Lines 13–15: seronegative animals without clinical signs. Arrows indicate recognition of antigenic bands in each of the three main antigenic areas.

In the remaining 33 seronegative animals (17%), 20 showed tissue cysts in both locations and 7 and 6 showed only SCC and vestibulum vaginae cysts, respectively. One seronegative animal with tissue cysts was seropositive in a previous sampling. A 6-year-old breeding bull in herd A remained seropositive throughout the study, whilst the youngest bull was seronegative; neither of the bulls showed clinical signs.

3.2. Incidence

The clinical incidence rates per 100 animals per year were very similar in all herds and varied from 12.5% to 16.7% (Table 2). New clinical cases were only studied in 26 animals without clinical signs in 2009 that remained in the herds until the last sampling. Sixteen of 26 animals developed clinical signs along the period studied. On the contrary, there was an apparent clinical recovery in 12 animals that exhibited tissue cysts in 2009 that were not

detected in 2013 (2 from herd A; 1 from herd B and 9 from herd C): (i) five of these animals were seropositive throughout the study, (ii) five of them were seronegative throughout the study, and (iii) two of them showed antibody fluctuations.

The serological incidence per 100 animals per year was 22 on average and remained nearly constant in herds B and C but for an increase up to 43.7 detected in 2013 in herd B (Table 2). In contrast, the incidence in herd A declined from 62.5% in 2010 to 0% in 2011 and rose up to 48.3% 2 years later (Table 2). There were 20 seronegative conversions (10 from herd A, 4 from herd B and 6 from herd C) in animals that mostly showed low/moderate RIPC values (9.7–20) throughout the study: (i) five showed clinical signs only at the beginning

of the study, (ii) ten showed clinical signs only at the end of the study (5 of these 10 were considered to be seropositive *a posteriori* by Western blot) and (iii) five did not show clinical signs.

3.3. Parasitemia

Parasitemia was analysed in the last three samplings of herd A (winter 2012, $n=67$; spring 2013, $n=66$ and winter 2013, $n=61$). One PCR positive result was detected in the last sampling. The PCR positive result corresponded to an 11-year-old female that showed SCC at the beginning and the end of the study and remained seropositive throughout the study.

Table 2. Incidence of *Besnoitia besnoiti* infection (95% CI)

Herd	Year	Serological incidence		Clinical incidence	
		No. Seroconverted per animal/year*	Rate/100 Animal/year	No. New clinical cases per animal/4 years*	Rate/100 Animal/year
A	2010	5/8	62.5 (28.9-96.0)	6/9	16.7 (0.0-41.0)
	2011	0/10	0.00		
	2012	0/15	0.00		
	2013	15/31	48.3 (30.7-65.9)		
B	2010	2/10	20.0 (0.0-44.8)	3/6	12.5 (0.0-38.9)
	2011	ND	ND		
	2012	2/8	25.0 (0.0-55.0)		
	2013	7/16	43.7 (19.4-68.0)		
C	2010	3/23	13.0 (0.0-26.7)	7/11	15.9 (0.0-37.5)
	2011	2/16	12.5 (0.0-28.7)		
	2012	2/15	13.3 (0.0-30.4)		
	2013	2/14	14.3 (0.0-32.6)		

*Number of incident cases out of the total of cattle at risk of infection from the beginning to the end of the studied period.

4. Discussion

There is a need to investigate the dynamics of *B. besnoiti* infection as well as the prevalence and incidence rates of the disease (EFSA, 2010). Accordingly, for the first time, we performed a longitudinal study over a 4-year period in 3 beef cattle herds located in an area where the disease is endemic. An accurate diagnostic protocol was carefully employed to optimize the detection of either clinically affected or subclinically infected cattle, which may act as parasite carriers (Liénard et al., 2011; Frey et al., 2013). First, experienced field veterinarians accomplished an exhaustive clinical inspection and detected gross clinical signs as well as mild clinical signs (i.e. SCC and tissue cysts in the *vestibulum vaginae*). Second, all serological techniques employed were recently validated for the detection of specific antibodies against *B. besnoiti* infection (García-Lunar et al., 2013a). Moreover, serological analyses were undertaken according to the present diagnostic recommendations: an initial screening was performed by ELISA; then, seronegative animals with clinical signs and seropositive animals with low RIPC values were further tested by an *a posteriori* tachyzoite-based Western blot under non-reducing conditions to optimize the Se and Sp of the ELISA test (García-Lunar et al., 2013a).

In the absence of a herd health scheme, high seroprevalence and high clinical prevalence rates of bovine besnoitiosis were detected in herds located in the Urbasa-Andía

Mountains, where bovine besnoitiosis has been widely reported for the last 25 years (Álvarez-García et al., 2014b). Seroprevalence and incidence rates higher than 50% and 20%, respectively, are considered as high in this work. However, these values are considerably higher in outbreaks of the disease (Fernández-García et al., 2010). These results are in accordance with seroprevalence rates reported by Gutiérrez-Expósito et al. (2014) in the Spanish Pyrenees. Additionally, animal seroprevalence rates reported by convenience sampling of at least 3 herds in other regions, where the disease is also traditionally endemic (i.e. Israel, South Africa and Nigeria), were higher than 50% (Goldman and Pipano, 1983; Janitschke et al., 1984; Sambo et al., 2014).

The 62% prevalence of mild clinical signs mainly consisted on the presence of tissue cysts in the sclera conjunctiva and/or *vestibulum vaginae*. The clinical prevalence of bovine besnoitiosis in areas where the disease is endemic has been reported to be 1–10% in *B. besnoiti*-infected herds (Jacquet et al., 2010). These data are in contrast to the higher prevalence rates of clinical bovine besnoitiosis reported here. This discrepancy may be explained by the fact that most clinical prevalence rates reported in the past were commonly based on the detection of gross lesions of the disease, such as skin lesions (Bwangamoi, 1968; Legrand, 2003; Chatikobo et al., 2013), and not on mild clinical signs (visible tissue cysts) that require an exhaustive clinical inspection and may

pass undiagnosed due to low parasite burdens. Bigalke (1968) claimed that sometimes a single cyst in only one eye was the only indication of infection. Our results are in agreement with Bigalke (1968), who reported that the clinical prevalence rates were close to 50% in two beef herds from South Africa based on the presence of SCC. However, Liénard et al. (2011) performed a similar clinical inspection in a longitudinal study in a dairy herd and reported a prevalence rate up to 22.8%; this discrepancy may be easily explained by the presence of different risk factors associated with management measures (Álvarez-García et al., 2014b). Moreover, in our study, tissue cysts were also detected in the *vestibulum vaginae*, which was not inspected in previous prevalence studies. Regarding animal age, older cattle had a higher probability of testing seropositive, and differences between the age ranges were observed in agreement with those reported in previous studies (Bigalke, 1968; Gutiérrez-Expósito et al., 2014).

The serological and clinical incidence rates of bovine besnoitiosis showed that parasite transmission was and maintained high over time. Remarkably, the highest incidence rates were observed in herd A, suggesting that natural mating practices may be an important risk factor due to efficient horizontal transmission throughout direct contact (Bigalke, 1968). Additionally, herd A relied on the purchase of non-tested animals from an infected herd and the use of a seropositive breeding bull for mating. Clinical

inspection results demonstrated the absence of severe clinical signs, with the only evidence the detection of the presence of SCC and cysts in the *vestibulum vaginae*. However, most of acutely infected animals went unnoticed because the infection may not cause severe clinical signs and inspections were performed sporadically (Gollnick et al., 2015). Several outbreaks of bovine besnoitiosis in beef herds were studied in the past. High seroprevalence rates were reported (higher than 70%), and gross clinical signs such as oedema, hyperkeratosis and alopecia were detected in 5–25% of the animals (Cortés et al., 2006a; Fernández-García et al., 2010). In contrast, Liénard et al. (2011) described an increase in the seroprevalence rate from 30% to 89.4% without gross clinical signs in a one-year longitudinal study of a dairy herd located in a region where the disease is endemic; the seasonal pattern of the rates was explained by blood-sucking arthropods bites. Similarly, García-Lunar et al. (2010) reported that the severity of clinical signs notably decreased whilst the seroprevalence rate remained high over time; this report is in agreement with the findings of the present study. Thus, differences observed in the serological and clinical incidence rates in this work and previous studies may be due to risk factors and the timing of *B. besnoiti* infection in the herds.

This work corroborates that an accurate diagnostic protocol should comprise the use of both clinical inspection and serological diagnosis because false seropositive results and seronegative animals with mild

clinical signs (SCC and/or tissue cysts in the *vestibulum vaginae*) represent the main diagnostic problems. Fortunately, only three false seropositive results by ELISA were detected in this target population. In contrast, the results showed the existence of an unexpectedly high percentage of seronegative animals with clinical signs (17%). A positive diagnosis based only on clinical signs should be carefully interpreted, and new cases of the disease could be overestimated. Ideally, the presence of the parasite should be confirmed by microscopic visualization of tissue cysts or PCR parasite detection in biopsies. However, *B. besnoiti* may remain undetected as parasite load may be low in subclinically infected cattle (Frey et al., 2013). Nevertheless, in the present study 83% of animals that showed at least one compatible clinical sign with the disease were seropositive by Western blot test. Moreover, the existence of seronegative animals with detectable tissue cysts has been already reported (Fernández-García et al., 2010; Liénard et al., 2011; Schares et al., 2011a, b). Similarly, in a study of equine besnoitiosis caused by *B. bennetti*, Ness et al. (2014) recently reported the presence of Western blot seronegative animals with clinical signs. Moreover, previous authors showed that endemic bovine besnoitiosis involves a high percentage of unapparent infections related to fluctuations in antibody levels, clinical recoveries and barely detectable mild clinical signs that may lead to false-negative results (Bigalke, 1968; Liénard et al., 2011). Indeed, the false seronegative results

detected in the present study may be due to the existence of long-lasting chronic infections.

The detection of parasitemia in a chronically infected animal has been reported for the first time in this work. In the past, parasitemia was exclusively reported during the acute stage of the infection in both naturally and experimentally infected cattle (Bigalke, 1968). A first explanation could be a contamination of the blood with destroyed tissues cysts from the needle, which is unlikely to occur due to the low parasite load. However, other possibilities related to the biology of the parasite should be also considered. In this case, a re-infection, reactivation or cyst rupture might be feasible explanations. Infected animals are exposed to re-infections in herds where bovine besnoitiosis is endemic. However, it has been postulated that a previous exposure to the parasite protects against clinical disease (Pols, 1960). In fact, this finding was the basis of the live vaccine employed by Bigalke et al. (1974). Otherwise, a possible reactivation may have favoured the re-exposure of the immune system to parasite antigens. However, there is no evidence for parasite reactivation, which would involve bradyzoite switching into the tachyzoite stage in *B. besnoiti* infection (Álvarez-García et al., 2014a). Finally, tissue cyst rupture may lead to transient parasitemia and antigen exposition to the immune system. Frey et al. (2013) described a significant increase in antibody levels related to the presence of ruptured cysts in a chronically infected cow. Nevertheless, regardless of the cause of parasitemia in this

case, the role that blood may play as a parasite source for vector-borne parasite transmission needs to be further investigated. In this work, white blood cells were chosen as the target for parasitemia detection.

However, extracellular tachyzoites have also been detected in acutely infected cattle (Bigalke, 1968). Due to the short period of time of the acute stage, the role of suckling arthropods in mechanical transmission is more likely to occur by inoculation of bradyzoites released from cysts. In fact, artificial transmission using blood-sucking arthropods and chronically infected animals as donors has been achieved (Bigalke, 1968). However, the presence of extracellular parasites in blood from chronically infected animals should not be ignored. How *Besnoitia* is able to persist over time in these herds needs further studies. Despite the complete life cycle and transmission routes of *B. besnoiti* are not fully elucidated what it is known is that most risk factors that may favour parasite transmission were present in these herds (Álvarez-García et al., 2013). Finally, older animals were more likely to be infected than younger ones. Most seropositive animals and clinical cases corresponded to animals older than 7 years ($P < 0.05$, χ^2) (Figure S1).

In conclusion, in the absence of a herd health scheme under a stable endemic situation, infected herds are characterized by high prevalence and incidence rates of seropositive and clinically affected animals. Thus, they maintain a high number of parasite carriers despite the fact that major disease

outbreaks are unlikely to occur due to the existence of premunition. Moreover, there is a high risk of infertility in recently acquired breeding bulls, which are usually traded because naive animals introduced into an endemic region contract the disease within the first year (Pols, 1960). In this scenario, reproductive and productive losses should be quantified to implement a cost-benefit control programme. These results demonstrate the need to combine both clinical inspection and serodiagnosis for an accurate diagnosis before implementing any control programmes. Specifically, an exhaustive clinical inspection of both the sclera conjunctiva and vestibulum vaginae coupled with Western blot is imperative in valuable animals (prior to selective culling and new entries), unless a serological technique with a similar performance to that of WB is developed. Finally, regular annual serological testing would help detect antibody fluctuations in sub-clinically infected animals.

Acknowledgements

This work was supported by a research project from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (AGL 2010-20561). Daniel Gutiérrez-Expósito has been financially supported by the Ministry of Economy and Competitiveness (Grant no. BES-2011-043753). Paula García-Lunar was supported by a fellowship from Complutense University of Madrid. We wish to acknowledge Vanesa Navarro Lozano and

Alejandro Jiménez-Meléndez for their excellent technical assistance and farmers of the herds for their help.

Conflict of Interest

The authors have no conflict of interest.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Figure S1. Serological and clinical dynamics of *Besnoitia besnoiti* infection. Age distribution and the presence of clinical signs and seropositivity of all sampled animals at the first and last samplings

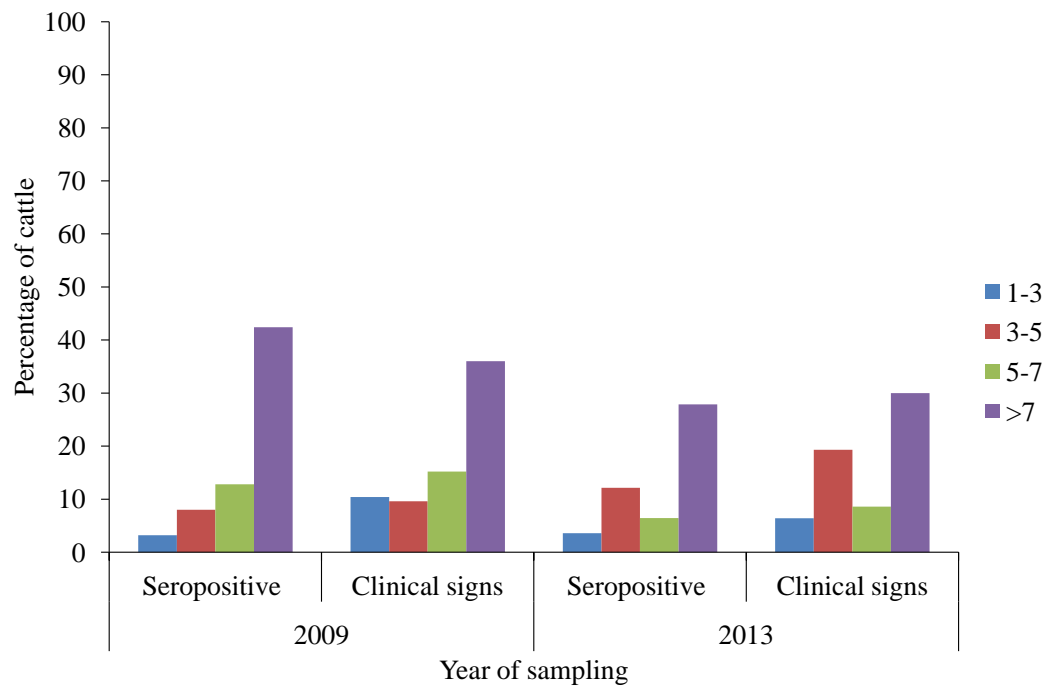


Figure S1. Serological and clinical dynamics of *Besnoitia besnoiti* infection. Age distribution and the presence of clinical signs and seropositivity of all sampled animals at the first and last samplings.

OBJETIVO 2. ESTUDIO DE LA INFECCIÓN POR *BESNOITIA* SPP. EN OTRAS ESPECIES DE RUMIANTES QUE PUEDEN ACTUAR COMO RESERVORIOS U HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS DE *B. BESNOITI*.

Resumen

En el segundo objetivo de la presente Tesis Doctoral se estudió el papel que juegan en la epidemiología de la besnoitiosis bovina los rumiantes silvestres y los pequeños rumiantes domésticos que comparten el mismo hábitat que el ganado bovino en extensivo. Para llevar a cabo este objetivo, inicialmente, se adaptaron, por primera vez, las técnicas serológicas (IFI, ELISA y Western blot) que se emplean en el ganado bovino en especies de rumiantes pertenecientes a las Familia y Subfamilia Cervidae y Caprinae, respectivamente. Para ello, se estudiaron las reacciones cruzadas existentes entre las especies *B. besnoiti* y *B. tarandi* (sub-objetivo 2.1). Ambas especies presentaron un patrón de reconocimiento homólogo y heterólogo idéntico de antígenos del taquizoíto mediante Western blot y los títulos obtenidos mediante IFI basada en el empleo de taquizoítos de *B. besnoiti* y *B. tarandi* difirieron en tan sólo una dilución. Posteriormente, se estandarizó la prueba ELISA para llevar a cabo dos estudios serológicos en rumiantes silvestres, siguiendo un protocolo diagnóstico serológico similar al descrito para la besnoitiosis bovina (sub-objetivo 2.2). Se empleó el ELISA como primera técnica de cribado serológico y el Western blot como técnica confirmatoria.

En un primer abordaje se muestrearon diversas zonas de la Península Ibérica donde conviven los rumiantes silvestres (el ciervo, el corzo, el rebeco y el muflón) y el ganado bovino, detectándose un corzo y un ciervo seropositivos en el Pirineo (sub-objetivo 2.2.). En un segundo estudio, se ampliaron las especies muestreadas, añadiendo otras como el gamo y la cabra montesa a las anteriores, y el número de muestras. Además, se seleccionaron exclusivamente zonas de España donde la besnoitiosis bovina estaba presente, ya fuera endémica (noreste) o en forma de brotes (suroeste). Nuevamente, sólo un corzo y un ciervo fueron seropositivos, también localizados en el Pirineo (sub-objetivo 2.3). La baja prevalencia de la infección demuestra la escasa relevancia de los rumiantes silvestres en la transmisión de la enfermedad al ganado bovino. Por lo tanto, estas especies no pueden considerarse buenos centinelas de la infección por *B. besnoiti*.

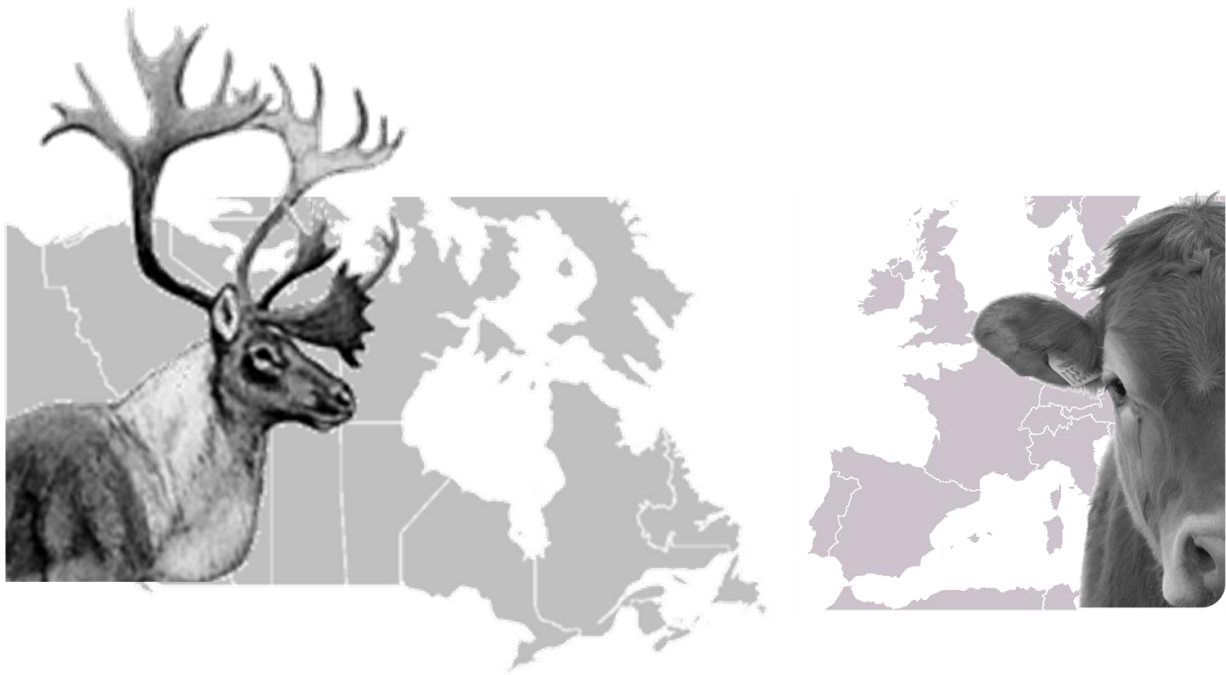
A pesar de los bajos valores de seroprevalencia detectados, la presencia del parásito se ha confirmado mediante técnicas moleculares en un ciervo y en un corzo del Pirineo Central (Huesca) y del Maestrazgo (Teruel), respectivamente (sub-objetivos 2.3 y 2.4). Además, el genotipado mediante el uso de microsatélites y la secuenciación del gen que codifica la proteína disulfuro-isomerasa (BbPDI) han demostrado que ambas especies pueden actuar como hospedadores intermediarios de *B. besnoiti*. Sin embargo, son necesarios nuevos marcadores filogenéticos y comparar el genoma de distintas especies o aislados para así confirmar la distinción entre las especies de *Besnoitia* que afectan a ungulados. Además, para completar los estudios

realizados en rumiantes silvestres, se estudió en profundidad un caso de besnoitiosis sistémica en un corzo macho de 6 a 8 meses de edad (sub-objetivo 2.4). Se realizó una descripción completa de las lesiones macroscópicas y microscópicas así como de la distribución intra-orgánica del parásito mediante histología y PCR (sub-objetivo 2.4). Los signos clínicos (p.ej. alopecia e hiperqueratosis en cabeza y extremidades) y la distribución intra-orgánica fue similar a la descrita en infecciones por *Besnoitia* spp. en otros ungulados (ganado bovino, burros y cabras), detectándose en éste caso una elevada carga parasitaria y una amplia localización de los quistes tisulares. La ausencia de quistes tisulares degenerados y el pequeño tamaño de los mismos (menor de 200 μm) fueron indicativos de una rápida progresión de la enfermedad. Asimismo, por primera vez se confirmó la capacidad de *B. besnoiti* para formar quistes tisulares en el sistema nervioso central. No obstante, el desarrollo de los quistes tisulares en ésta localización pudo verse limitado por la respuesta inmunitaria dado el pequeño tamaño de los mismos (20-70 μm) respecto al resto de localizaciones (100-200 μm).

Finalmente, en relación al estudio de la infección por *Besnoitia* spp. en pequeños rumiantes domésticos (sub-objetivo 2.5), se seleccionaron zonas donde la besnoitiosis bovina es endémica (los Pirineos y Guadalajara). Se siguió un protocolo serológico de diagnóstico similar al utilizado en los estudios en rumiantes silvestres. Aunque no se detectaron anticuerpos específicos frente a *Besnoitia* spp., este trabajo es el primer estudio realizado en ovejas y cabras de Europa y constituye una primera aproximación para futuros estudios. En principio, los pequeños rumiantes no intervendrían en el ciclo biológico de *B. besnoiti* aunque se trata de un estudio preliminar, cuyos resultados deberían corroborarse con un mayor número de muestras y zonas muestreadas. La infección no debe descartarse en éstas especies ya que los mayores censos de ovino y caprino de la Unión Europea se encuentran en países donde la besnoitiosis bovina ha sido declarada (p.ej. Francia e Italia).

Sub-objetivo 2.1

Adaptación de técnicas serológicas para el diagnóstico de la besnoitiosis en rumiantes silvestres.





Serological evidence of *Besnoitia* spp. infection in Canadian wild ruminants and strong cross-reaction between *Besnoitia besnoiti* and *Besnoitia tarandi*

Daniel Gutiérrez-Expósito^a, Luis Miguel Ortega-Mora^a, Alvin A. Gajadhar^b, Paula García-Lunar^a, Jitender P. Dubey^c, Gema Álvarez-García^{a*}

^aSALUVET, Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain

^bCentre for Food-borne and Animal Parasitology, Canadian Food Inspection Agency, Saskatoon, Saskatchewan S7N 2R3, Canada

^cAnimal Parasitic Disease Laboratory, Animal Natural Resources Institute, Agricultural Research Service, United States Department of Agriculture, Beltsville, MD 20705, USA

Article history:

Received 8 February 2012

Received in revised form 18 June 2012

Accepted 18 June 2012

Keywords: *Besnoitia besnoiti*, *Besnoitia tarandi*, Cattle, Caribou, Indirect immunofluorescent antibody test, Western blot.

Abstract

Bovine besnoitiosis, caused by *Besnoitia besnoiti*, is considered to be emergent in Europe and responsible for severe economic losses due to the chronic and debilitating course of the disease but has not been reported in North America. *Besnoitia tarandi* is a related species and it has been reported in reindeer and caribou from different locations of the Arctic Pole, including North America. Diagnosis of clinical besnoitiosis is largely based on the recognition of dermal grossly visible tissue cysts of *Besnoitia*. Nothing is known of cross reactivity between *B. besnoiti* and *B. tarandi* species. Here, we evaluated the use of serological tests employed in the diagnosis of bovine besnoitiosis for the detection of *Besnoitia* spp. infections in different wild ruminant species (caribou, elk, mule-deer, white-tailed deer, moose, muskox and bison) from Canada and investigated cross-reactivity between *B. besnoiti* and *B. tarandi* species by indirect immunofluorescence antibody test and Western blot. For this, species-specific antibodies were obtained in rabbits experimentally infected with *B. besnoiti* and *B. tarandi*. Marked cross reactivity was found between *B. besnoiti* and *B. tarandi*. For the first time, antibodies to *Besnoitia* spp. infection were found in 16 of 20 caribou (*Rangifer tarandus*), seven of 18 muskox (*Ovibos moschatus*), one of three bison (*Bison bison*), but not in 20 elk (*Cervus canadensis*), 20 white tailed deer (*Odocoileus virginianus*), and 20 moose (*Alces alces*) in Canada; results were similar using *B. besnoiti* and *B. tarandi* as antigen. There was no cross reactivity between the two *Besnoitia* species, *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* with the cut-offs applied that prevented to observe it. The present study provides evidence that the serological assays can be useful to accomplish large scale prevalence studies in caribou and other wildlife species. Further studies are needed to study sylvatic and domestic cycle of *B. tarandi* and *B. besnoiti*.

*Corresponding author. Tel.: +34 913944095; fax: +34 913944098. E-mail address: gemaga@vet.ucm.es (G. Álvarez-García).
0304-4017/\$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.06.017>

1. Introduction

The genus *Besnoitia* is a cyst forming coccidian of the Family Sarcocystidae and 10 species are currently recognized: *B. akadoni*, *B. bennetti*, *B. besnoiti*, *B. caprae*, *B. darlingi*, *B. jellisoni*, *B. neotomofelis*, *B. oryctofelisi*, *B. tarandi* and *B. wallacei* (Nganga et al., 1994; Dubey et al., 2003a, b, c, 2004, 2005; Oryan and Azizi., 2008; Dubey et al., 2010). The domestic cat is the only known definitive host, and it has been described in the life cycle of *B. darlingi*, *B. wallacei*, *B. oryctofelisi* and *B. neotomofelis*. In the intermediate host, tachyzoites are found in many organs during the acute phase of the infection, which in cattle is known as anasarca stage and characterized by hyperthermia, subcutaneous oedema and orchitis among others. Bradyzoites then develop within microscopic and macroscopic tissue cysts in fibroblasts at various locations, but mainly in the subcutaneous connective tissue, scleral conjunctiva and the vagina. Subsequently, dermal lesions typical of the chronic phase of infection develop, and are known as scleroderma stage which is characterized by a progressive thickening, hardening and folding of the skin, hyperkeratosis and alopecia (Bigalke, 1981).

Bovine besnoitiosis caused by *B. besnoiti* was first reported by Besnoit and Robin (1912) in cattle from France and later in blue wildebeest and impala from South Africa (McCully et al., 1966). Currently the disease is widely distributed in Africa, Asia

and in the south-western Europe. In Europe, bovine besnoitiosis has recently emerged from traditional endemic areas (Pyrenees and Alentejo region of Portugal) and is expanding to previously free neighboring regions and countries where it is responsible for severe economic losses (EFSA, 2010). Concerning the other species affecting large ruminants, *B. tarandi* was originally described in reindeer and caribou from Alaska (USA) by Hadwen (1922) but the parasite has not been seen in mainland USA. Similar infections characterized by the presence of macroscopic and microscopic tissue cysts in wild caribou, reindeer, mule deer, and musk ox in Canada (Choquette et al., 1967; Wobeser, 1976; Ayroud et al., 1995; Leighton and Gajadhar, 2001), and in reindeer and roe deer in Sweden, Finland, Russia and Spain have been attributed to *B. tarandi* species (Leighton and Gajadhar, 2001; Dubey et al., 2004). *Besnoitia tarandi* was recently re-described from naturally infected reindeer from Finland using molecular and *in vitro* cultivation (Dubey et al., 2004). Many aspects of the epidemiology of this disease remain unknown, such as the prevalence and incidence of the infection in endemic areas, transmission routes and putative wild reservoirs. It is uncertain whether the *Besnoitia* species infecting different wild ruminants in Canada and other countries are same as *B. tarandi* from reindeer from Finland.

Recent molecular characterization

studies demonstrated a close relationship among *Besnoitia* species (*B. caprae*, *B. besnoiti*, *B. bennetti* and *B. tarandi*) that affect ungulates (goats, cattle, equids and wild ruminants, respectively) (Kiehl et al., 2010; Namazi et al., 2011). Ellis et al. (2000) reported an identical ITS₁ sequence in both *B. besnoiti* and *B. caprae* in agreement with Schares et al. (2011b), who also compared *B. tarandi* and *B. bennetti*. In addition, these *Besnoitia* species cause similar clinical signs in all affected ungulates, at least during the chronic phase of the disease with the characteristic *Besnoitia* spp. tissue cysts and lesions in the skin. Thus, the similarities and differences among *B. besnoiti* and these species should be investigated to clarify the epidemiology of the various infections and, in particular, to assess the risk of infection for cattle. Little is known of serological cross reactivity among different species of *Besnoitia* that cause dermal lesions in large animals.

In cattle, *B. besnoiti* infection has been traditionally diagnosed mainly by clinical inspection. Recently, attempts have been made to develop and validate sensitive and specific serological tests for the diagnosis of bovine besnoitiosis. These serological tests include the indirect fluorescent antibody test (IFAT), commercial and *in-house* enzyme linked immunoabsorbent assays (ELISA), modified agglutination test (MAT) and Western blots (Shkap et al., 1984, 2002; Cortés et al., 2006c; Fernández-García et al., 2009a; Fernández-García et al., 2010; Schares

et al., 2010, 2011a; Waap et al., 2011; García-Lunar et al., 2013a).

The aim of the present work was to evaluate the currently used IFAT and Western blot tests in bovines for the detection of *Besnoitia* spp. infection in wild ruminant species and to determine the level of cross-reactivity between *B. besnoiti* and *B. tarandi* in sera from wild ruminants and cattle.

2. Material and methods

2.1. Serum samples

All serum samples of wild ruminants were from across northern regions of western Canada were collected from various sources between 1995 and 2009 and kept frozen at the Canadian Food Inspection Agency Centre for Food-borne and Animal Parasitology, Saskatoon, Canada. A total of 94 samples used in this study were from caribou (*Rangifer tarandus*, *n*=20), elk (*Cervus canadensis*, *n*=20), mule-deer (*Odocoileus hemionus*, *n*=1), white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*, *n*=20), moose (*Alces alces*, *n*=12), musk ox (*Ovibos moschatus*, *n*=18) and bison (*Bison bison*, *n*=3). The samples were analyzed here by SALUVET research group at Complutense University of Madrid. Age and sex data of the animals sampled were unavailable.

All cattle sera analyzed (*n*=48) were from a herd in Navarra, Spain, with a history of endemic besnoitiosis. These samples were

obtained from animals with clinical signs consistent with clinical besnoitiosis, either acute (fever, swelling of superficial lymph nodes and oedema), or chronic infection scleroderma, hyperkeratosis, alopecia or orchitis in males and tissue cysts in scleral conjunctiva), or asymptomatic but seropositive animals. These animals came from an area where farms share grazing pastures and are exposed to wild ruminants (e.g. red deer) and bloodsucking arthropods which are putative vectors for *Besnoitia* species in summer (Bigalke, 1968).

All serum samples were tested for evidence of infection with *B. besnoiti* and *B. tarandi* using IFAT and Western blot was used to confirm IFAT positive results. Additionally, cross reactivity with *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection was also investigated.

2.2. Parasite production for serological procedures

Culture-derived tachyzoites of *Besnoitia* species, *N. caninum* and *T. gondii* were used to prepare antigens. The *B. besnoiti* strain Bb-Spain₁ was the one originally isolated from a naturally infected cow in Spain (Fernández-García et al., 2009b) and maintained in cell culture. The *B. tarandi* strain was isolated in 2003 from a reindeer in Finland (Dubey et al., 2004). For the present study, the isolate frozen from the original culture in 2003 was revived in cell culture in 2009 and transported to SALUVET in 2009. Both

Besnoitia species were maintained at SALUVET *in vitro* by serial passages in MARC-145 cell cultures with Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), 15 mM HEPES (pH 7.2), 2 mM glutamine, penicillin (100 U/ ml), streptomycin (100 mg/ ml) at 37 °C in a 5% CO₂ humidified incubator. Propagated tachyzoites were transferred to fresh media every 4 days at approximately 1:5 host:parasite cell ratio. To obtain tachyzoite extracts for Western blot, tachyzoites were passed through a 25-gauge needle, separated on a PD10 column (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK) and concentrated by centrifugation at 1350× g for 10 min at 4 °C (Fernández-García et al., 2009b).

Tachyzoites of *N. caninum* Nc-1 isolate was originally obtained from a dog (Dubey et al., 1988) and a ovine strain of *T. gondii* (Me49) (Lunde and Jacobs, 1963) were maintained *in vitro* and purified as previously described (Pérez-Zaballos et al., 2005).

Pellets with tachyzoites were frozen at -80°C until used or resuspended in PBS to a final concentration of approximately 10⁷ formalin-fixed tachyzoites per ml for use in IFAT (Fernández-García et al., 2009a).

2.3. Rabbit hyperimmune sera

Rabbit hyperimmune sera were produced against tachyzoites of *B. besnoiti* (n=2: R₁ and R₂) and *B. tarandi* (n=2: R₃ and R₄). Briefly, three-month-old N-Z albino rabbits raised in

captivity were immunized intra-dermally with tachyzoites (10^8 /rabbit) resuspended in an equal volume of Freund's complete adjuvant (Sigma®) for the first injection and intramuscularly with tachyzoites (10^8 /rabbit) resuspended in Freund's incomplete adjuvant at 4, 8 and 12 weeks post-primary injection. Sera were collected 4 weeks after the last immunization. Pre-immune sera collected from these rabbits were used as controls. Serum samples were stored at -80°C until used. All samples were assayed by both *B. besnoiti* and *B. tarandi* based IFATs and Western blots.

2.4. IFAT

All ruminant and rabbit sera were diluted to 1:50 and 1:100, respectively, and assayed by IFAT (Fernández-García et al., 2009a) using the appropriate secondary antibodies for the host species. Appropriate positive and negative control sera from naturally infected cattle were used (Fernández-García et al., 2009a).

Fluorescein Isothiocyanate (FITC)-labeled anti-deer IgG antibody conjugate (02-31-06 KPL, Gaithersburg, MD, USA) was used for caribou, elk, mule-deer, white-tailed deer and moose, and FITC-labeled anti-bovine IgG (Sigma®) for cattle, musk ox, and bison and anti-rabbit IgG (488-Alexa, Invitrogen®, Eugene, Oregon, USA) for hyperimmune rabbit sera. Intact tachyzoite membrane fluorescence at titres \geq than 1:100 were considered positive for *Besnoitia* spp. infection in cattle (García-Lunar et al., 2013a),

whereas this cut-off value for wild ruminants was chosen according to the best agreement obtained with the Western blot technique. Samples were considered positive for *N. caninum* and *T. gondii* if tachyzoites had specific fluorescence at \geq 1:100 dilutions, in agreement with Stieve et al. (2010). Positive samples were titrated by means of double serial dilutions.

2.5. SDS-PAGE and Western blot

B. besnoiti and *B. tarandi* tachyzoites were processed and Western blots were carried out as previously described (Álvarez-García et al., 2002; Fernández-García et al., 2009a). Sera from wild ruminants and rabbits were used at a 1:20 and 1:100, respectively. Tachyzoites were exposed to sera from caribou, elk, mule deer, white-tailed deer and moose and to a rabbit FITC-labeled anti-deer IgG antibody conjugate (02-31-06 KPL, Gaithersburg, MD, USA) (1:400), and after three washes with TBS-T (Tris-phosphate-buffered with 0.05% Tween-20) for 10 min each, to a monoclonal antibody anti rabbit IgG conjugated with peroxidase (1:1000) (Sigma®). We used as secondary antibodies a mouse monoclonal anti-bovine IgG₁/IgG₂ (9D8-P, Laboratorios LSI, Lissieu, Francia) (1:400) for cattle, musk ox and bison and the previous anti-rabbit IgG for hyperimmune sera under the same conditions.

A result was considered as positive if at least the 37.1 kDa immunodominant antigen (IDA) was recognized (Fernández-García et al., 2009a). An animal was

considered seropositive if the presence of specific antibodies was confirmed by Western blot analysis.

2.6. Data analysis

Test agreement (expressed as Kappa-values), including 95% confidence intervals (95% CI), were calculated using WinEpiscope 2.0 (<http://www.clive.ed.ac.uk>).

3. Results

3.1. Test agreement (κ -statistics)

When the same tests (IFAT or Western blot) based on different antigens (*B. besnoiti* and *B. tarandi* tachyzoites or extracts, respectively) were compared almost perfect agreement was observed ($\kappa = 0.8-1$) (Table 1). However pair wise comparisons including IFAT (regardless the cut-off employed) and Western blot showed moderate agreement no matter the antigen employed. An IFAT cut-off of 1:50 was selected based on a better agreement with Western blot ($\kappa=0.672$ and $\kappa=0.632$ for 1:50 versus $\kappa=0.580$ and $\kappa=0.473$ for 1:100 cut-off) since Western blot is considered to be a very specific test (García-Lunar et al., 2013a).

3.2. IFAT for infection with *B. besnoiti* and *B. tarandi*

By IFAT antibodies to *Besnoitia* spp. infection were found in cattle, caribou, musk ox and bison (Tables 2, 3). Specific antibodies

to *B. besnoiti* and *B. tarandi* were higher in cattle (89.5 and 91.6 % respectively) and caribou (75 and 65 % respectively) than musk ox (38. 8% for both species) or bison (33. 3% for both species). Evidence of *Besnoitia* infection was not found in any of the elk, moose, mule deer and white tailed deer.

Table 1: Test agreement. κ -Values (95% CI)

	IFAT						Western Blot					
	<i>B. besnoiti</i>			<i>B. tarandi</i>			<i>B. besnoiti</i>			<i>B. tarandi</i>		
	1:50	1:50	1:100	1:50	1:50	1:100	1:50	1:50	1:100	1:50	1:50	1:100
IFAT												
<i>B. besnoiti</i>	0.94 (0.74-1.14)	0.62 (0.43-0.81)	0.77 (0.58-0.97)	0.94 (0.74-1.14)	0.67 (0.483-0.87)	0.83 (0.63-1.03)	0.62 (0.43-0.81)	0.67 (0.48-0.87)	0.77 (0.58-0.97)	0.67 (4.74-0.87)	0.63 (4.74-0.87)	0.67 (4.74-0.87)
<i>B. tarandi</i>	0.94 (0.74-1.14)	0.62 (0.43-0.81)	0.77 (0.58-0.97)	0.94 (0.74-1.14)	0.67 (0.483-0.87)	0.83 (0.63-1.03)	0.62 (0.43-0.81)	0.67 (0.48-0.87)	0.77 (0.58-0.97)	0.63 (4.74-0.87)	0.63 (4.74-0.87)	0.63 (4.74-0.87)
Western Blot												
<i>B. besnoiti</i>	0.67 (4.74-0.87)	0.67 (4.74-0.87)	0.52 (0.32-0.72)	0.63 (0.43-0.83)	0.82 (0.62-1.02)	0.52 (0.32-0.72)	0.58 (0.38-0.78)	0.52 (0.32-0.72)	0.52 (0.32-0.72)	0.47 (0.27-0.67)	0.47 (0.27-0.67)	0.47 (0.27-0.67)
<i>B. tarandi</i>	0.67 (4.74-0.87)	0.67 (4.74-0.87)	0.47 (0.27-0.67)	0.63 (0.43-0.83)	0.58 (0.38-0.78)	0.47 (0.27-0.67)	0.58 (0.38-0.78)	0.58 (0.38-0.78)	0.47 (0.27-0.67)	1 (0.80-1.20)	1 (0.80-1.20)	1 (0.80-1.20)

*IFAT titers considered as cut-off

The IFAT titers for *B. besnoiti* were higher in cattle and caribou (up to 1:800 and 1:400, respectively), whereas for *B. tarandi* they were higher in caribou, musk ox (up to 1:400) and cattle (up to 1:800). The IFAT titer for both *Besnoitia* species in bison was 1:50 (Table 3).

3.3. Western blot for antigens of *B. besnoiti* and *B. tarandi*

One and three caribou were seronegative by IFAT for *B. besnoiti* and *B. tarandi*, respectively, also had positive results by Western blot. Moreover, 16 of 20 caribou were seropositive for both *Besnoitia* species (Fig. 1). All samples from elk, mule deer, white tailed deer, moose, musk ox and bison were seronegative. Specific antibodies to *B. besnoiti* and *B. tarandi* in cattle by Western blot were 83.3 and 91.6 %, respectively. Common IDAs recognized in all positive samples corresponded to 46.3, 39.6, 37.1, 33.0, and 14.2 kDa proteins (Figs. 1 and 2).

3.4. Identification of *B. besnoiti* and *B. tarandi* antigens in hyperimmune rabbit sera.

Serum samples were titrated for both *B. besnoiti* and *B. tarandi* infections by IFAT and Western blot. Concerning homologous recognition immunized rabbits developed 1:800 and 1:1600 IFAT titers for *B. besnoiti* (R1 and R2) and *B. tarandi* (R3 and R4), respectively. In addition, regarding heterologous recognition 3 out of 4 rabbit

sera showed 1:800 IFAT titers against *B. besnoiti* (R2) or *B. tarandi* (R3 and R4). Antibody titers obtained by Western blot in all samples corresponded to 1:800, and the same pattern of antigen recognition was detected for both *Besnoitia* species as mentioned above (Fig. 3A-B).

Table 2: *B. besnoiti*, *B. tarandi*, *N. caninum* and *T. gondii* antibody prevalence in ruminants by IFAT

Animal species	<i>B. besnoiti</i>	<i>B. tarandi</i>	<i>N. caninum</i>	<i>T. gondii</i>
Cattle	43/48 (89.5%)	44/48 (91.6%)	1/48 (2%)	Not done
Caribou	15/20 (75%)	13/20 (65%)	1/20 (5%)	2/20 (10%)
Elk	0/20 (0%)	0/20 (0%)	5/20 (25%)	9/20 (45%)
Mule-deer	0/1 (0%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)	0/1 (0%)
White-tailed deer	0/20 (0%)	0/20 (0%)	15/20 (75%)	8/20 (40%)
Moose	0/20 (0%)	0/20 (0%)	2/20 (10%)	0/20 (0%)
Musk ox	7/18 (38.8%)	7/18 (38.8%)	0/18 (0%)	0/18 (0%)
Bison	1/3 (33.3%)	1/3 (33.3%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)

Table 3: *B. besnoiti* and *B. tarandi* IFAT antibody titer distribution in cattle, caribou, musk ox and bison

	Cattle		Caribou		Muskox		Bison	
	<i>B. besnoiti</i>	<i>B. tarandi</i>	<i>B. besnoiti</i>	<i>B. tarandi</i>	<i>B. besnoiti</i>	<i>B. tarandi</i>	<i>B. besnoiti</i>	<i>B. tarandi</i>
1:50	0	0	6	4	4	1	1	1
1:100	12	18	4	4	3	2	0	0
1:200	16	15	2	3	0	2	0	0
1:400	5	9	3	2	0	3	0	0
1:800	10	2	0	0	0	0	0	0

The cross-reactions found on IFAT were confirmed by Western blot using three representative dilutions (1:100, 1:200 and 1:400). There was a clear heterologous recognition by hyperimmune sera (*B. besnoiti* tachyzoites extract against *B. tarandi* hyperimmune serum and *vice versa*) and the same pattern of recognition independent of the protein extract and sera employed were obtained (Fig. 3C-D).

3.5. *N. caninum* and *T. gondii* infections

As shown in Table 2, *N. caninum* and *T. gondii* antibody prevalences were higher in elk (25 and 45%, respectively) and white-tailed deer (75 and 40 %, respectively) than in caribou (5 and 10 %, respectively). Evidence for *T. gondii* infection was not found in moose, mule-deer, musk ox and bison. All sera from mule-deer, musk ox and bison were negative to *N. caninum*. Serum from only one cattle was positive for *N. caninum* infection.

4. Discussion

This is the first report of serological evidence of *Besnoitia* infection in wild ruminants in

Canada. It was not possible to distinguish *B. tarandi* infection due to the presence of significant cross-reactions with *B. besnoiti* by both IFAT and Western blot. Thus, it is not known if the seropositive wild ruminants were infected with only *B. tarandi* or with other *Besnoitia* species.

In the present study specific antibodies to *B. besnoiti* and *B. tarandi* were detected in 75 and 65% of caribou, respectively.

Besnoitiosis can cause a debilitating disease in caribou producing ulcers in body and head, thickened and wrinkled skin and bilateral alopecia, and microscopic cysts in the dermis (Choquette et al., 1967; Wobeser, 1976). The disease has also been described in mule deer, roe deer and musk ox. It has been suggested the infection in all of these wild ruminants maybe caused by *B. tarandi* (Leighton and Gajadhar, 2001). However, in the present study *Besnoitia* spp. antibodies were not found in elk, mule deer, white tailed deer and moose. Although specific IFAT antibody titers were detected in musk ox and bison these positive results were not confirmed by Western blot. The absence of specific antibodies may be due to small sample size. Indeed, *B. tarandi* infection in Canadian musk ox has been previously found, but not confirmed by molecular

assays (unpublished data). Moreover, discrepancies found between IFAT and Western blot results with sera from musk ox and bison are not surprising, because most IFAT titers found were low (1:50 - 1:100), and maybe non specific (García-Lunar et al., 2013a).

The commonly accepted diagnostic procedure for bovine besnoitiosis involves a combination of clinical inspection and serological assays such as ELISA, Western blot, and IFAT. This combination of methods is necessary in order to detect seronegative but clinically affected animals, and seropositive cattle without clinical signs. However, in previous studies, *B. tarandi* infection was diagnosed by visual inspection of skin lesions and tissue cysts together with histological examination to confirm the presence of tissue cysts (Glover et al., 1990). Nevertheless, histological examination is not recommended in routine diagnosis since subclinical but chronically infected animals may remain undetected due to the presence of a low number of tissue cysts (EFSA, 2010). The high percentage of seropositive caribou found in the present study highlights the widespread occurrence of the infection in this species, although our sample size was small. Moreover if the epidemiology of the disease in caribou is similar to that of bovine besnoitiosis in endemic areas it is expected that only a small proportion of animals will develop clinical signs (Jacquiet et al., 2010).

Consequently, *Besnoitia* infection in wild ruminant species is likely to be underestimated. A possible emergence of the disease in the Arctic region has been suggested to be similar to that of bovine besnoitiosis in Europe (Olias et al., 2011). A prospective study in the Canadian province British Columbia reported dermal *B. tarandi* infections in 23% (71/311) of caribou. In addition, a recent work on caribou herds from northern Quebec, Canada support this emergence (Kutz et al., 2009).

Because the samples were generated over a very long period of time (1995-2009) and the lack of data origin, it cannot be excluded that there was a sampling bias which may have influenced the outcome of the study. To determine the true prevalence of *Besnoitia* infection in wild ruminant species, large scale surveys are required. These studies are needed as *Besnoitia* infection may be contributing to declines of caribou and reindeer across the Arctic Polar regions. Declines in these animal populations have recently been reported (Vors and Boyce, 2009).

Since cross-reactions between members of Sarcocystidae Family is a common occurrence at low IFAT titers, in particular between *N. caninum* and *B. besnoiti* (Shkap et al., 2002), we investigated possible cross-reactions with specific antibodies directed against *N. caninum* and *T. gondii* by IFAT.

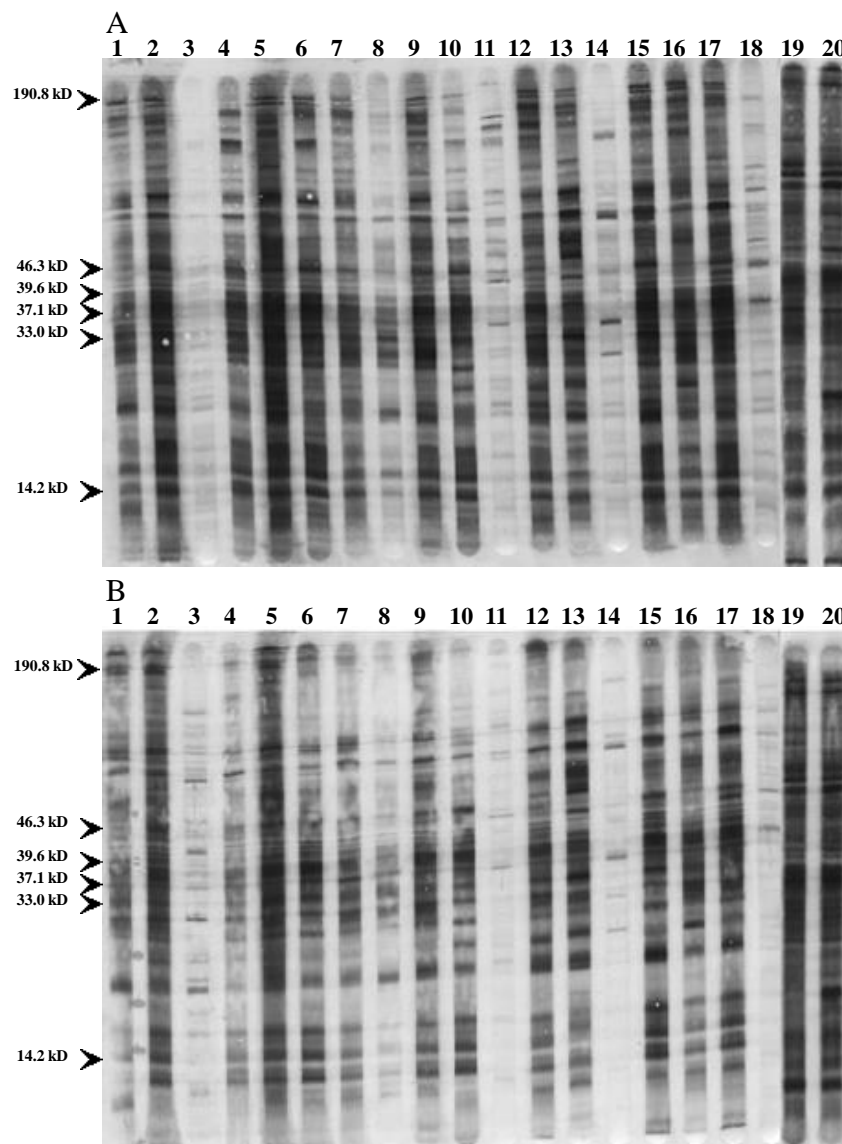


Fig. 1. Recognition of *B. besnoiti* and *B. tarandi* tachyzoite antigens by caribou sera by Western blot. Panel A: *B. besnoiti* tachyzoite extract. Panel B: *B. tarandi* tachyzoite extract. Lanes 3, 11, 14 and 18: negative sera. Rest of lanes: positive sera. Lane 1: negative to *B. besnoiti* and *B. tarandi* by IFAT. Lanes 4 and 8: negative to *B. tarandi* by IFAT

Stieve et al. (2010) also reported low prevalence rates of *N. caninum* infection of 11.5, 0.5 and 0% in caribou, moose and deer, respectively, and 0.4% in caribou and 0% in moose and deer for *T. gondii* infection in Alaska.

In our study, most animals seropositive for *N. caninum* or *T. gondii* were shown to be seronegative for *Besnoitia* spp. with the subsequent absence of evidence of

cross reaction between *Besnoitia* species and *N. caninum* or *T. gondii*. These results do not support a serological cross-reaction between *Besnoitia* spp. and *N. caninum* or *T. gondii*.

To our knowledge, serological cross-reactions between species of *Besnoitia* have not been previously described.

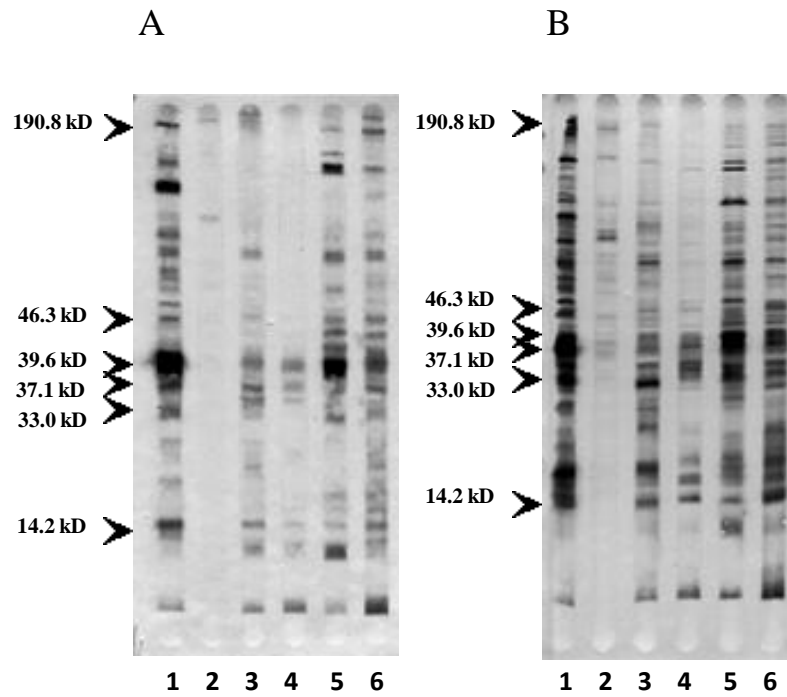


Fig. 2. Recognition of *B. besnoiti* and *B. tarandi* tachyzoite antigens by cattle sera by Western blot. Panel A: *B. besnoiti* tachyzoite extract. Panel B: *B. tarandi* tachyzoite extract. Lanes 1 and 2: Positive and negative control, respectively. Lanes 3–6: positive sera. Arrows indicate recognition of IDAs.

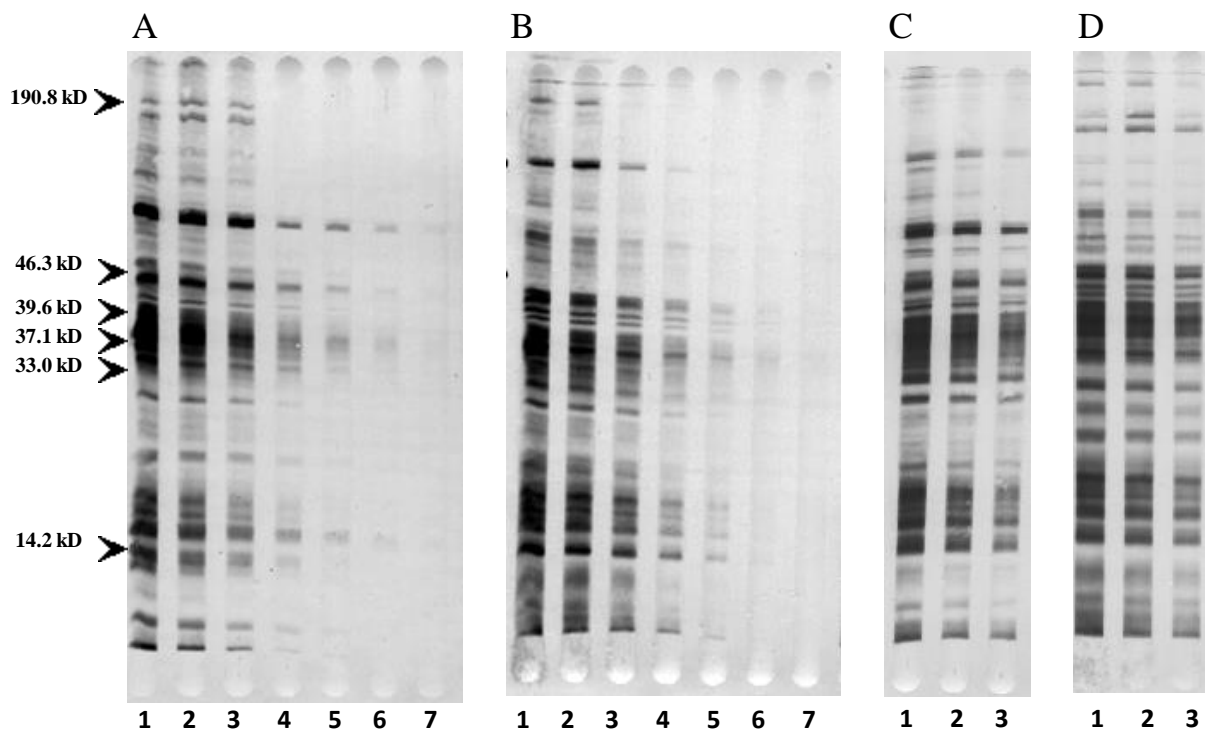


Fig. 3. Homologous and heterologous antigen recognition of *B. besnoiti* and *B. tarandi* by sera from rabbits immunized with tachyzoites of these species. A: Homologous recognition of *B. besnoiti* antigen (R1). B: Homologous recognition of *B. tarandi* antigen (R3). C: Heterologous recognition of *B. tarandi* antigen (R1). D: Heterologous recognition of *B. besnoiti* antigen (R3). Numbers indicate double serial dilutions of each serum starting from 1:100 (lane 1) to 1:6400 (lane 7). Double serial dilutions of heterologous recognition are 1:100 (lane 1), 1:200 (lane 2) and 1:400 (lane 3). Arrows indicate recognition of IDAs.

The results obtained with experimentally immunized rabbit sera against *B. besnoiti* and *B. tarandi* tachyzoites corroborated the cross-reactions observed between *B. tarandi* and *B. besnoiti*, as the pattern was identical in both homologous as well as heterologous antigen recognition. Fernández-García et al. (2009a) reported IDAs of 190.8, 46.3, 39.6, 37.1, 33.0 and 14.2 kDa, which have been also recognized in the present study, by sera from rabbits, cattle and wild ruminants independently the *Besnoitia* species extract used in the Western blots.

Molecular tools have shown that different isolates of a unique species within Family Sarcocystidae may display genetic variation, as is the case for *Hammondia* spp., *N. caninum* and *T. gondii* (Abel et al., 2006; Regidor-Cerrillo et al., 2006; Su et al., 2010). However, research on genetic variability in *Besnoitia* spp. is complex due to the existence of only 56 ETSs available in the data bases and no genetic differences have been found when several *B. besnoiti* isolates of bovine origin were compared (Bb Spain, Bb1Evora03, Bb2Evora03, Bb-GER1, Bb Israel, Bb-Italy1) (Dubey et al., 2003a; Cortés et al., 2006b; Fernández-García et al., 2009b; Schares et al., 2009; Gentile et al., 2012).

The taxonomy of *Besnoitia* species infecting large animals (*B. besnoiti*, *B. tarandi*, *B. bennetti* and *B. caprae*) is not definitive because their life cycles are unknown. Molecular tools currently available

also do not provide conclusive evidence because *B. besnoiti*, *B. tarandi*, *B. bennetti* and *B. caprae* share the same ITS1 sequence. Therefore, PCR tests based on the amplification of this ribosomal region do not discriminate between these parasite species (Ellis et al., 2000; Schares et al., 2011b). There is only one old unconfirmed study that used isoenzyme electrophoresis to evidence differences in the banding pattern between two *Besnoitia* strains from bull and wildebeest, respectively (Le Blancq et al., 1986). Differences in antigenicity among isolates, previously reported for other isolates from the closely related species *N. caninum* (Atkinson et al., 1999), may explain different prevalence rates of *Besnoitia* spp. infection in caribou and cattle, depending on the antigen employed (tachyzoites from *B. tarandi* or *B. besnoiti*, respectively). In other closely related parasites, antigenic differences among *Sarcocystis neurona* isolates were analyzed by Western blot (Mansfield et al., 2001), and the pattern of recognition was similar, as we observed for *B. besnoiti* and *B. tarandi* in the present study. In *Neospora*, dense granule proteins GRA6 and GRA7 of *N. hughesi* and *N. caninum* species have been compared by Western blot analysis and PCR, and significant differences between the nucleotide and deduced amino acid sequences as well as variations in the pattern of heterologous recognition using hyperimmune rabbit sera were reported (Walsh et al., 2001).

DIGE or 2D Western blot proteomic tools could help for a more comprehensive study of the differences in protein abundances or antigens between *B. besnoiti* and *B. tarandi*. A similar approach was carried out recently between *N. caninum* and *T. gondii* by Zhang et al. (2011) where at least 18 and 19 protein spots of *N. caninum* and *T. gondii* were cross-reacted with anti-*T. gondii* and anti- *N. caninum* hyperimmune sera, respectively, versus 24 and 12 individual protein spots which did not cross-react, respectively. However, Regidor-Cerrillo et al. (2012) identified differentially expressed proteins in the tachyzoite stage across three *N. caninum* isolates: the virulent Nc-Liv and Nc-Spain 7 isolates, and the attenuated Nc-Spain 1H isolate. Proteomic approaches may also lead to the identification of species-specific antigens which might be used as serodiagnostic markers.

Regarding intermediate hosts range, experimental infection studies have been performed in gerbils and rabbits with *B. tarandi* and several isolates of *B. besnoiti*. Rabbits and gerbils developed typical besnoitiosis when they were inoculated with live *B. besnoiti* (Pols, 1954; Bigalke, 1967; Shkap et al., 1987a) but were refractive to experimental infection with millions of live *B. tarandi* (Dubey et al., 2004). However, experimental infection of cattle with *B. tarandi* and experimental infection of wild ruminants with *B. besnoiti* have not been described. Differences in virulence may not be conclusive since significant differences in

virulence has been also reported between European, Israeli and South African *B. besnoiti* isolates (Basso et al., 2011; Bigalke, 1968; Shkap et al., 1987a), as well as it occurs in isolates of *B. caprae*, *N. caninum* and *T. gondii* species (Grigg and Suzuki, 2003; Oryan et al., 2010; Regidor-Cerrillo et al., 2010).

In conclusion, the first serological results obtained in sera from wild ruminants from Canada confirm the occurrence of *Besnoitia* infection in caribou and the serological assays employed in the present study can be useful to accomplish large scale prevalence studies in these wild ruminant species. However, serological cross-reactions between *B. besnoiti* and *B. tarandi* do not permit discrimination between these infections. Besnoitiosis related epidemiological studies such as the link between sylvatic and domestic life cycles of *Besnoitia* spp. in wild ruminants and cattle remain unknown. Thus, surveys on susceptible wild and domestic ruminant species should be conducted in areas of the world where the disease occurs. Finally, other species such as *B. bennetti* and *B. caprae* affecting ungulates, are relatively unknown, including the epidemiology, and should be considered in further studies.

Acknowledgements

This work was supported by a research project from Spanish Ministry of Science and Innovation (AGL 2010-20561). Daniel

Gutiérrez Expósito has been financially supported by the Ministry of Science and Innovation (Grant no. BES-2011-043753). We thank wildlife Canadian veterinarians and Javier Zabala and Mikel Serrano for kindly providing sera from wild ruminants and cattle and Jane Benjamin and other staff at the CFIA's Centre for Food-borne and Animal Parasitology for maintaining and

retrieving wildlife serum samples. We wish to acknowledge Vanessa Navarro and Carmen Cuevas for their excellent technical assistance.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest.

Sub-objetivo 2.2

Primer estudio serológico de la infección por *Besnoitia* spp. en rumiantes silvestres de Europa.





First serosurvey of *Besnoitia* spp. infection in wild European ruminants in Spain

Daniel Gutiérrez-Expósito^a, Luis. M. Ortega-Mora^a, Ignasi Marco^b, Mariana Boadella^c, Christian Gortázar^c, José María San Miguel-Ayanz^d, Paula García-Lunar^a, Santiago Lavín^b, Gema Álvarez-García^{a*}

^aSALUVET, Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040 Madrid, Spain

^bServei d'Ecopatologia de Fauna Salvatge (SEFaS), Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain

^cSaBio (Sanidad y Biotecnología) - IREC (CSIC-UCLM-JCCM), Ronda de Toledo s/n, Ciudad Real, Spain

^dTechnical Services for Ruminants, Pfizer Animal Health, Pfizer, S.A. 28108 Alcobendas, Madrid, Spain

Article history:

Received 19 February 2013

Received in revised form 17 May 2013 Accepted 19 May 2013

Keywords *Besnoitia* spp. Europe, Spain, Serosurvey, Wild ruminants, Western blot, ELISA

Abstract

Besnoitia besnoiti has been reported to affect cattle, wildebeest, kudu and impala, and *B. tarandi* other wild ruminants (caribou, reindeer, mule deer and musk ox), causing similar characteristic clinical signs and lesions. However, both *Besnoitia* species have been reported in different geographical areas and the link between the sylvatic and domestic life cycles of *Besnoitia* spp. in wild ruminants and cattle remains unknown. The aim of this study was to evaluate the presence of specific antibodies against *Besnoitia* spp. in wild ruminants in Spain. A wide panel of sera from red deer (*Cervus elaphus*) ($n=734$), roe deer (*Capreolus capreolus*) ($n=124$), chamois (*Rupicapra pyrenaica*) ($n=170$) and mouflon (*Ovis musimon*) ($n=20$) collected from different locations of Spain was analyzed. Beef cattle were present in all sampled areas and, interestingly, bovine besnoitiosis has been widely reported in some of them (e.g., Pyrenees and Central Spain). Sera samples were first examined with an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). For red deer and roe deer, the ELISA was standardized with positive and negative control sera from several Cervidae species (100% Se and 98% Sp). Chamois and mouflon sera samples were tested with a previously reported ELISA validated for bovine sera (97% Se and 95% Sp) using protein G as a conjugate. Positive results by ELISA were confirmed *a posteriori* with a tachyzoite-based Western blot. Sixty-one sera samples from red deer and 17 sera samples from roe deer were seropositive or doubtful by ELISA. All samples from mouflon were seronegative and 15 sera samples from chamois were considered doubtful. *B. besnoiti* exposure was only confirmed clearly by Western blot in one red deer and one roe deer from the Spanish Pyrenees where the disease is traditionally endemic.

This is the first serological report of *Besnoitia* spp. infection carried out in European wild ruminants and the results show that specific antibodies are present at least in red deer and roe deer. Thus, wild ruminants from endemic regions of bovine besnoitiosis should be further studied because they may be putative reservoirs of the parasite.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Corresponding author. Tel.: +34 913944095; fax: +34 913944098. E-mail addresses: gemaga@vet.ucm.es, gemalgar@yahoo.es (G. Álvarez-García).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.05.017>

Publicado en *Veterinary Parasitology*, 2013. 197 (3-4), 557-564
Presentado en el I Congreso APICOWPLEXA. Lisboa, Portugal, 2012.

1. Introduction

Parasites of the genus *Besnoitia* are classified in the subfamily Toxoplasmatinae, family Sarcocystidae, phylum Apicomplexa. This genus currently comprises 10 species: *B. akadoni*, *B. bennetti*, *B. besnoiti*, *B. caprae*, *B. darlingi*, *B. jellisoni*, *B. neotomofelis*, *B. oryctofelisi*, *B. tarandi* and *B. wallacei*; four of these species (*B. caprae*, *B. besnoiti*, *B. bennetti* and *B. tarandi*) have been reported to affect ungulates (goats, bovids, equids and wild ruminants, respectively) (Dubey and Yabsley, 2010; Kiehl et al., 2010; Namazi et al., 2011; Olias et al., 2011).

B. besnoiti (Marotel, 1912) is responsible for bovine besnoitiosis, a re-emergent, chronic and debilitating disease in Europe traditionally endemic in some regions of France, Portugal and Spain (European Food Safety Authority, 2010). Cattle and wild bovids act as the intermediate host (IH) for this parasite. The life cycle of this parasite consists of two asexual and infective stages, the fast-replicating tachyzoites and the slow-dividing bradyzoites gathered inside tissue cysts (Bigalke, 1981).

Wild ruminants (reindeer, caribou, mule deer, roe deer and muskox) have been described to act as the intermediate host for *B. tarandi*, a species that was first reported in reindeer (*Raginifer tarandus tarandus*) and caribou (*Raginifer tarandus caribou*) by Hadwen (1922) in Alaska (USA) through microscopical observation. To date, this disease has also been described in Canada,

Sweden, Finland, Russia and Spain (Levine, 1961; Choquette et al., 1967; Wobeser, 1976; Ayroud et al., 1995; Leighton and Gajadhar, 2001; Dubey et al., 2004; Ducrocq et al., 2012). In Spain, *Besnoitia* spp. tissue cysts were visualized microscopically in a skin biopsy from a roe deer (Fernández de Luco et al., 2000).

Clinical signs consist of a progressive thickening, hardening and folding of the skin, hyperkeratosis and alopecia; these signs are observed during the chronic stage of infections with both *Besnoitia* spp. (Bigalke, 1981). In addition, pathognomonic tissue cysts in the upper respiratory tract, testes, scleral conjunctiva and mucous membranes of the *vestibulum vaginae* and vagina can be observed (Jacquet et al., 2010).

Many biological and epidemiological aspects of the *Besnoitia* spp. that infect ungulates remain unknown, including the complete life cycle, the definitive host (DH) and the role of wild animals as reservoirs for the infection (Diesing et al., 1988; Olias et al., 2011). Some authors have suggested that both domestic and wild cats could act as definitive hosts for *B. besnoiti* and for other *Besnoitia* spp. (*B. darlingi*, *B. wallacei*, *B. oryctofelisi* and *B. neotomofelis*) (Wallace and Frenkel, 1975; Dubey, 1977; Rommel, 1978). However, these observations have not been reproduced by others (Diesing et al., 1998; Basso et al., 2011). Therefore, the definitive host and the link between the domestic and putative sylvatic life cycle of the parasite remain to be

elucidated (Millán et al., 2012). Moreover, recent molecular characterization studies have reported close relationships among *Besnoitia* species that affect ungulates (Namazi et al., 2011). This finding is in accordance with reports of Ellis et al. (2000) who found no difference between the ITS1 region sequences of *Besnoitia* species and isolates affecting cattle, wildebeest and goats. On the other hand, serological tools currently available are not able to differentiate *Besnoitia* spp. affecting ungulates, and strong serological cross reactions have been recently reported between *B. besnoiti* and *B. tarandi*, and between *B. besnoiti* and *B. bennetti* (Gutiérrez-Expósito et al., 2012; Ness et al., 2012).

Thus, the aim of the present work was to evaluate the presence of specific antibodies against *Besnoitia* spp. in European wild ruminants to elucidate the putative role of these animals in the life cycle of *Besnoitia* spp.

2. Material and methods

2.1. Serum samples and experimental design

A total of 1048 wild ruminant serum samples were collected between 2005 and 2012 from different locations in northern, central and southern Spain. The species sampled included red deer (*Cervus elaphus*, $n=734$), roe deer (*Capreolus capreolus*, $n=124$),

chamois (*Rupicapra pyrenaica*, $n=170$) and mouflon (*Ovis musimon*, $n=20$). Both male and females from different age groups were sampled (Table 1). Sampled areas included endemic regions of bovine besnoitiosis and previously *Besnoitia*-free regions where the disease has been recently reported (Table 2, Fig. 1). Interestingly, most wild ruminants share pastures with cattle under extensive management and are also exposed to bloodsucking arthropods in all sampled areas. Blood samples were collected from thoracic fluid or by intra-cardiac puncture and kept at -20°C until further analysis. All sera samples were first analyzed by ELISA in an initial screening. Subsequently, positive and doubtful results were confirmed *a posteriori* using tachyzoite-based Western blot under non-reducing conditions (Fernández-García et al., 2009a; Schares et al., 2010; García-Lunar et al., 2013a).

2.2. Cell culture and antigen purification

Tachyzoites of *B. besnoiti* (BbSp-1 isolate) (Fernández-García et al., 2009b) were grown in a Marc-145 cell monolayer with DMEM supplemented with 5% fetal calf serum and purified following a previously described procedure (Fernández-García et al., 2009b). These zoites were used in both ELISA and Western blot informed by the results obtained previously by Gutiérrez-Expósito et al. (2012). Tachyzoites were pelleted and frozen at -80°C for Western blot. Soluble

tachyzoite antigens used in the ELISA were prepared and quantified as previously described (Álvarez-García et al., 2002) and maintained at -80°C until use.

2.3. ELISA

B. besnoiti tachyzoite soluble extract was used as an antigen due to the existence of a strong cross-reaction between *B. tarandi* and *B. besnoiti* (Gutiérrez-Expósito et al., 2012). Serum samples were analyzed in duplicate, and the mean value of the optical density (OD) was converted into a relative index percent (RIPC) by the following formula: $RIPC = (OD_{405} \text{ sample} - OD_{405} \text{ negative control}) / (OD_{405} \text{ positive control} - OD_{405} \text{ negative control}) \times 100$. For the analysis of Cervidae samples, well coded panel of 73 sera from Canadian Cervidae ($n=16$ seropositive and $n=57$ seronegative to both) was used. Confirmation of *B. besnoiti* and *B. tarandi* infection by Western blot (Gutiérrez-Expósito et al., 2012) was used to standardize an *in-house* ELISA.

For this test, a rabbit peroxidase-labeled anti-deer IgG (H+L) antibody conjugate (04-31-06 KPL, Gaithersburg, MD, USA) (diluted at 1:800) was used. Positive control sera samples were composed of a pool of three positive Cervidae sera with RIPC values between 85.25 and 108.49 and with IFAT titers higher than 1:100. A pool of four Cervidae sera, negative by both ELISA and IFAT, was used as a negative control. A non-parametric two-graph receiver operating characteristic (TG-ROC) analysis was applied for the selection of the cut-off value and diagnostic performance of this ELISA using Western blot as the gold standard technique (Greiner et al., 1995) (Fig. 2). For chamois and mouflon sera we used a secondary antibody protein G (recombinant-peroxidase labeled, Sigma ®) diluted at 1:10000; the cut-off value was selected on the basis of three standard deviations of OD values obtained with seronegative sheep samples. Positive and negative control sera consisted of well-characterized bovine samples (Fernández-García et al., 2010) because protein G has a high binding affinity for ruminant IgGs.

Table 1: Sex and age data of sampled wild ruminants

Species	Sex		Age (years)				
	Male	Female	Unknown	< 1	1-4	>4	Unknown
Red deer (<i>Cervus elaphus</i>) (n=734)	229	335	170	52	257	45	380
Roe deer (<i>Capreolus capreolus</i>) (n=124)	64	31	29	5	86	5	28
Chamois (<i>Rupicapra pyrenaica</i>) (n=170)	84	66	20	0	35	79	56
Mouflon (<i>Ovis musimon</i>) (n=20)	8	8	4	1	2	5	12
Total	385	440	223	58	380	134	476

2.4. SDS-PAGE and Western blot

B. besnoiti tachyzoites were processed with SDS-PAGE and Western blots were carried out under non-reducing conditions as previously described by García-Lunar et al. (2013a). Tachyzoites were first exposed to sera from roe deer, red deer and chamois at 1:20 dilution, and then to a rabbit peroxidase-labeled anti-deer IgG (H+L) antibody conjugate (04-31-06 KPL, Gaithersburg, MD, USA) diluted at 1:200 for Cervidae sera and to protein G (Recombinant-Peroxidase Labeled, Sigma ®) diluted at 1:5000 for chamois sera. The Western blot used for testing sera from Cervidae species was based on the protocol

used in previous studies that showed the best performance. Serum dilution was the same as for cattle sera (García-Lunar et al., 2013a), whereas appropriate dilution of conjugate was determined with positive and negative Canadian caribou sera that were used as controls (Gutiérrez-Expósito et al., 2012).

Three antigenic areas are described for the tachyzoite-based Western blot under non-reducing conditions, and the recognition of at least three bands in at least two of the three main antigenic areas described is considered a positive result (García-Lunar et al., 2013a).

Table 2a: Detection of anti-*Besnoitia* spp. specific antibodies by different serological tools in sera from wild ruminants

Species (sampled animals)	Origin ^a (sampled animals)	ELISA (RIPC ≥ 16 and ≤ 37)	ELISA (RIPC > 37)	Western blot
Red deer (<i>Cervus elaphus</i>) (734)	Asturias (30)	2	0	0/2
	Avila (23)	0	0	ND
	Barcelona (7)	0	0	ND
	Cádiz (122)	10	6	0/16
	Cantabria (30)	0	1	0/1
	Ciudad Real (30)	0	0	ND
	Guadalajara (15)	0	0	ND
	Huesca (2)	0	0	ND
	Lerida (75)	0	1	1/1
	Navarra (30)	2	0	0/2
	Teruel (25)	1	0	0/1
	Toledo (315)	36	2	0/38
	Zaragoza (30)	0	0	ND
	<i>Total</i>	<i>51</i>	<i>10</i>	<i>1/61</i>
Roe deer (<i>Capreolus capreolus</i>) (124)	Asturias (30)	2	0	0/2
	Barcelona (1)	0	0	ND
	Burgos (11)	5	0	0/5
	Cádiz (28)	2	1	0/3
	Gerona (12)	2	0	0/2
	Lerida (38)	3	0	1/3
	Soria (4)	1	1	0/2
	<i>Total</i>	<i>15</i>	<i>2</i>	<i>1/17</i>

Table 2b: Detection of anti-*Besnoitia* spp. specific antibodies by different serological tools in sera from wild ruminants

Species (sampled animals)	Origin ^a (sampled animals)	ELISA (OD >0.30)	Western blot
Chamois (<i>Rupicapra pyrenaica</i>) (170)	Asturias (30)	0	ND
	Barcelona (14)	0	ND
	Gerona (50)	9	0/9
	Lerida (76)	6	0/6
	<i>Total</i>	<i>15</i>	<i>0/15</i>
Mouflon (<i>Ovis musimon</i>) (20)	Gerona (19)	0	ND
	Lerida (1)	0	ND

^a Regions with cases of bovine besnoitiosis are shown in bold

ND: Not Done

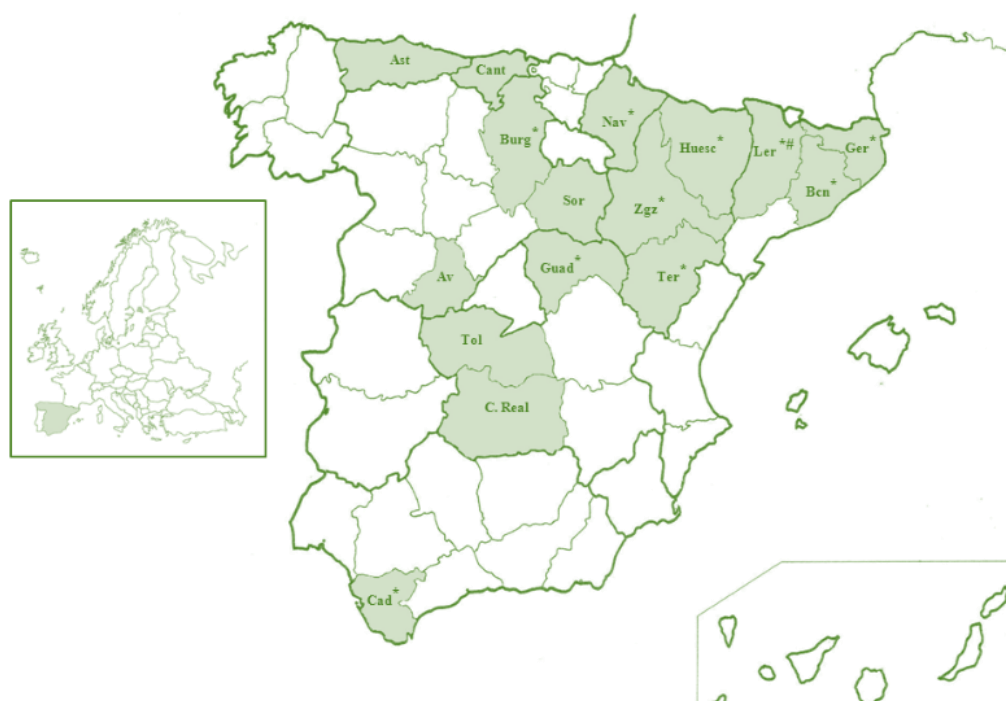


Figure 1: Origin of sera from wild ruminants. Sampled Spanish provinces are shown in grey and annotated with abbreviated names: Ast: Asturias; Av: Ávila; Bcn: Barcelona; Burg: Burgos; Cad: Cádiz; Cant: Cantabria; C. Real: Ciudad Real; Ger: Gerona; Guad: Guadalajara; Huesc: Huesca; Ler: Lérida; Nav: Navarra; Sor: Soria; Ter: Teruel; Tol: Toledo; Zgz: Zaragoza. *Endemic regions and where the disease has been previously reported. # Seropositive animals by Western blot.

3. Results

3.1. ELISA

TG-ROC analysis carried out for the standardization of the Cervidae ELISA test yielded a wide range of cut-offs with

sensitivity (Se) and specificity (Sp) values higher than 95% (Fig. 2). A conservative cut-off (negative values with RIPC <16; positive values with RIPC >37) yielding 100% Se and 98% Sp was established to increase the chance of detecting specific antibodies against *Besnoitia* spp. because a RIPC value

of 37 was the lowest RIPC value obtained with positive reference sera. Accordingly, RIPC values between 16 and 37 and higher than 37 were considered doubtful and positive results, respectively (Table 2). Ten sera samples from red deer and 2 sera samples from roe deer were seropositive, and 51 and 15 sera samples from red deer and roe deer, respectively, were considered doubtful by ELISA.

Regarding the ELISA developed to test chamois and mouflon samples a conservative cut-off with OD values higher than 0.30 was established. No evidence of *Besnoitia* spp. infection was found in mouflon, whereas 15 out of 170 chamois were classified as seropositive by ELISA (Table 2).

3.2. Western blot

A total of 12 and 81 seropositive and doubtful samples, respectively (Table 2) were analyzed by tachyzoite-based Western blot under non-reducing conditions (García-Lunar et al., 2013a). Thus, the presence of *Besnoitia* spp. specific antibodies could only be confirmed in one seropositive red deer and one doubtful roe deer sample (Table 2). Red deer serum recognized all immunodominant antigens (IDAs) described in each antigenic area, whereas roe deer serum recognized only two IDAs in area I (72.5 and 51.4), all IDAs in area II (38.7, 31.8, 28.5) and three IDAs in area III (19.1, 17.4, 14.5) (Fig. 3) (García-Lunar et al., 2013a). The seropositive red deer was an 8-year-old male; the age and sex of the roe deer were unknown.

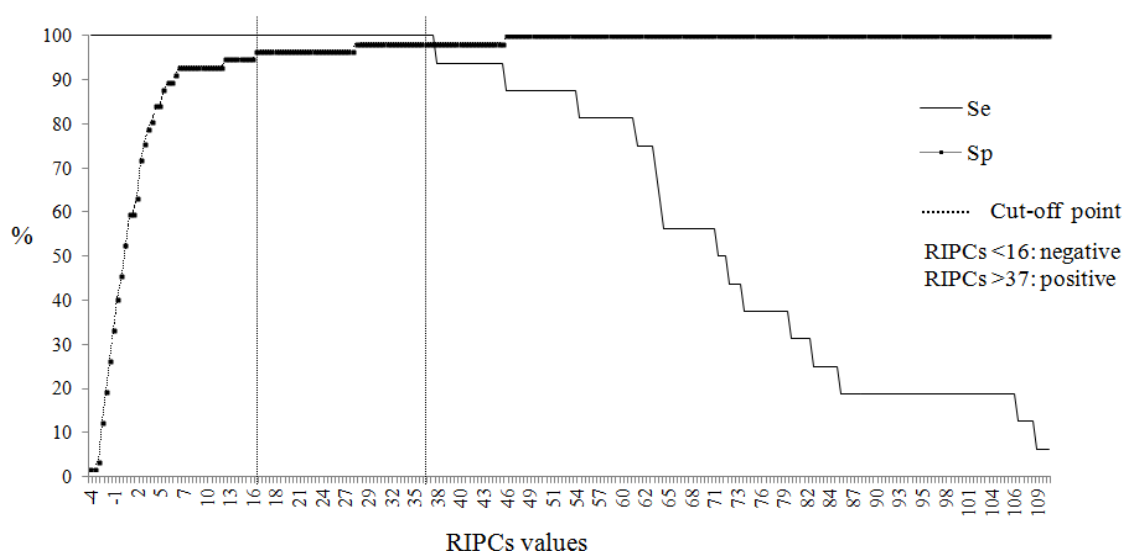


Figure 2: TG-ROC analysis of the ELISA developed for Cervidae samples using Western blot results as the gold standard.

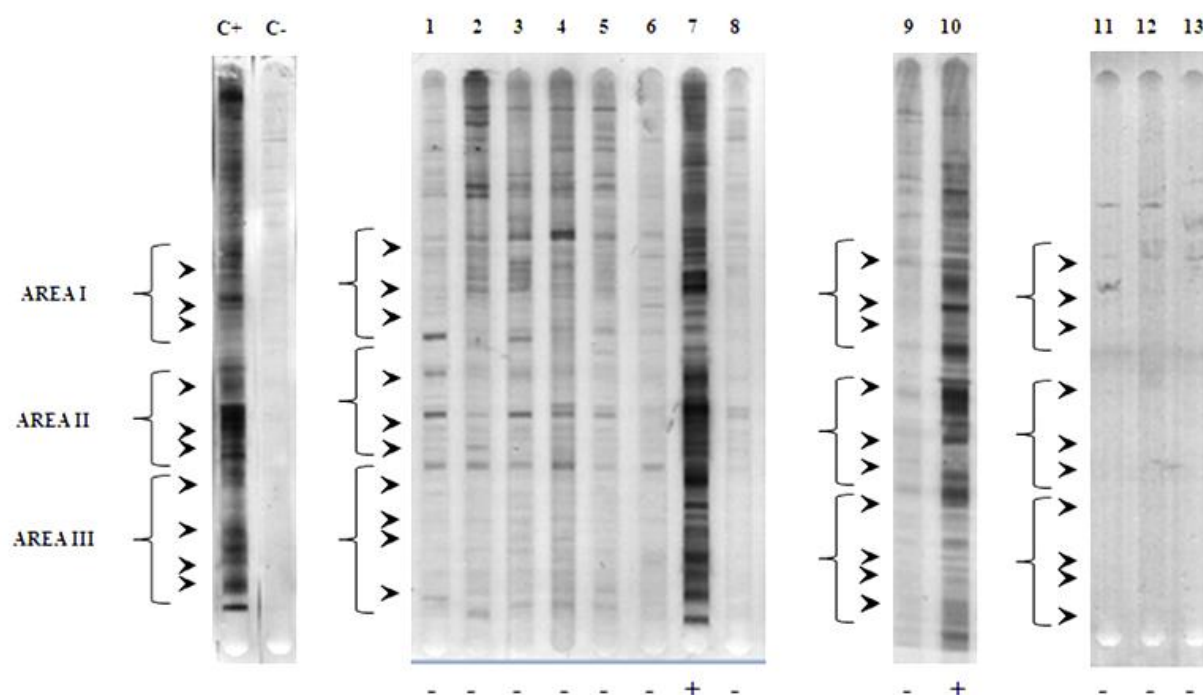


Figure 3: Western blot analysis of ELISA-positive Cervidae samples. Lines 1-8: Red deer samples. Lines 9-10: Roe deer samples. Lines 12-13: Chamois samples. Arrows indicate recognition of antigenic bands in each of the three main antigenic areas.

4. Discussion

This is the first large-scale serosurvey to search for specific antibodies against *Besnoitia* spp. in wild ruminants in Europe. Specific antibodies against *Besnoitia* spp. were detected with well-standardized serological tools in one red deer and one roe deer in Spain.

In a previous study, Western blot was successfully employed to detect antibodies against *Besnoitia* spp. in Cervidae samples from Canada; seropositive sera from caribous showed identical antigen pattern, irrespective of the *Besnoitia* species used in both tests (tachyzoites from *B. besnoiti* and *B. tarandi*) (Gutiérrez-Expósito et al., 2012). Thus, these valuable and well characterized serum samples were used in the present

study to standardize an ELISA for the diagnosis of *Besnoitia* spp. infection in Cervidae species (red deer and roe deer) for the first time. This novel ELISA displayed high Se and Sp values by TG-ROC analysis. In a previous inter-laboratory comparative study, ELISAs displayed high Se and Sp, proving that they are suitable tools to conduct prevalence studies in cattle and possibly other species (García-Lunar et al., 2013a). Schares et al. (2013) also developed a novel Apure-BbELISA based on purified *B. besnoiti* tachyzoite antigens. Consequently, it seems appropriate to adapt these tools to testing sera from wild ruminants in large-scale serosurveys. However, this new ELISA test developed for Cervidae sera may require further adjustment to appropriately extend its validation to the target population in case

a panel of positive reference animals is available (Jacobson, 1998). On the other hand, it is not surprising that false-positive reactions were obtained when a new target population was tested. This limitation of serological diagnosis has been reported for bovine besnoitiosis. Nasir et al. (2012) found 18.4% of cattle to be seropositive by ELISA, however these animals subsequently proved to be negative by Western blot. In this sense, Western blot has proved to be not only a sensitive assay for the diagnosis of bovine besnoitiosis (Fernández-García et al., 2009a; Schares et al., 2010; García-Lunar et al., 2013a) but also an appropriate confirmatory test due to its high specificity (Gutiérrez-Expósito et al., 2012; Nasir et al., 2012). Therefore, it seems appropriate to employ Western blot in a similar manner to confirm or negate the presence of specific antibodies against *Besnoitia* spp. in wild ruminants. The existence of cross-reactions with closely related parasites and/or poor sample quality (several samples were hemolyzed thoracic fluids) may have influenced the detection of false positive results. A previous study reported no evidence of cross-reactions of *Besnoitia* spp. with *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* by IFAT in wild ruminants (Gutiérrez-Expósito et al., 2012). However, cross-reactions between *Besnoitia* spp. and *Sarcocystis* spp. may occur, as several *Sarcocystis* species have also been described in cervids and wild bovids (Dubey et al., 1989). *S. cruzi* is distributed in cattle worldwide and over 90% of adult cattle have

been found to be infected in many countries (Moré et al., 2011). Schares et al. (2010), however, did not observe cross-reactivity with two sera of cattle experimentally infected with *S. cruzi*. Thus, a higher number of well characterized sera samples should be further investigated because high anti-*Sarcocystis* spp. antibody levels may influence the specificity of the test.

In this study, specific antibodies against *Besnoitia* spp. were detected for the first time in wild ruminants from Spain. Interestingly, both animals came from the Pyrenees, a region where bovine besnoitiosis is endemic. Bovine besnoitiosis was initially described in France in 1912 by Besnoit and Robin near the Pyrenees and has spread from local areas in the Spanish and French Pyrenees to neighboring regions in the last 20 years (Irigoien et al., 2000; Alzieu et al., 2007; EFSA, 2010; Liénard et al., 2011). Our findings together with those of a previous report of a roe deer naturally infected with *Besnoitia* spp. in the same region (Fernández de Luco et al., 2000) support the hypothesis that at least red deer and roe deer may play a role in the sylvatic life cycle of *Besnoitia* spp. Interestingly, all sera from wild ruminants came from areas where the disease has been previously reported or from areas that have features related to the epidemiology of the disease such as presence of both cattle and wild ruminants and exposure to blood sucking arthropods in summer. However, the low number of seropositive samples found may be because only 325 out of the 1048

samples ($n=114$ red deer, $n=51$ roe deer) were collected in traditionally endemic regions of the disease (Pyrenees and mountainous regions from Navarra). Based on the present results, wild and domestic ruminants from endemic regions of bovine besnoitiosis should be further studied to clarify the spread and importance of this parasitic disease and to help authorities implement preventive measures to prevent the spread of the disease. EFSA has made similar recommendations to address the possible significant increase in infections in beef cattle and wild ruminant populations and the role that they might play in parasite transmission, at least in Spain. Indeed, beef cattle populations have changed considerably in the last decades due to the common agricultural policy (CAP). The reduction in milk production and the support of sustainable rural livelihoods has led to an exponential increase in beef cattle raised under extensive management to the detriment of dairy cattle (census available at <http://www.magrama.gob.es>). Furthermore, European wild ruminant populations have notably increased in size (Apollonio et al., 2010). In particular, some studies carried out in northern Spain have shown evidence of a huge resurgence in ungulate populations from the mid-XIXth century to the end of XXth century (Gortázar et al., 2000). This resurgence is most likely due to the abandonment of fields, the advance of forests and hunting management practices (Acevedo et al., 2005). Consequently, a change in the

density of these host species might favor the spread of the disease by increasing the chance of transmission from vectors to host species.

However, no evidence of *Besnoitia* spp. infection has been observed either in chamois or mouflon despite the fact that several of the sampled chamois ($n=140$) and mouflons ($n=20$) came from areas where the bovine disease is endemic. Nevertheless a higher number of sera should be analysed in order to elucidate whether both wild Caprinae species might be putative wild reservoirs since besnoitiosis has also been reported in other Caprinae species (goats from Iran) (Oryan and Azizi, 2008).

Thus, the results obtained in the present study suggest a link between the sylvatic and domestic life cycles of *Besnoitia* spp. similar to the links observed in the life cycles of other closely related apicomplexan parasites. Indeed, the link between the sylvatic and domestic life cycles of *N. caninum* and *T. gondii* has been reported by others (Gondim, 2006; Panadero et al., 2010). In particular, the results obtained in recent studies carried out in Spanish wild ruminants (IH) and wild carnivores (DH) have suggested that this issue could have important implications for the epidemiology of both diseases (Gauss et al., 2006; Almería et al., 2007; Sobrino et al., 2007, 2008). The seroprevalence rates of *T. gondii* in wild ruminants of 15.06% and 21.08% were described in red deer and roe deer, respectively, by modified agglutination test

(MAT). Specific antibodies against *N. caninum* were detected in 11.08% and 6.1% of red deer and roe deer, respectively, by IFAT.

The DH for *Besnoitia* still remains obscure – a recent serosurvey of 205 wild carnivores in Spain failed to detect any specific *Besnoitia* spp. antibodies (Millán et al., 2012).

In conclusion, this is the first serological report of *Besnoitia* spp. infection in Spanish wild ruminants. The results showed that specific antibodies against *Besnoitia* spp. are present at least in red deer and roe deer. Wild ruminants from endemic regions of bovine besnoitiosis should be further studied and parasite isolation combined with molecular tools (Madubata et al., 2012) should be attempted to confirm the role of these animals as intermediate hosts of

Besnoitia spp. and to determine whether they are reservoirs of *B. besnoiti*.

Acknowledgements

This work was supported by a research project from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (AGL 2010-20561). Daniel Gutiérrez Expósito has been financially supported by the Ministry of Economy and Competitiveness (grant no. BES-2011-043753). Finally, we wish to acknowledge Vanessa Navarro Lozano and Alicia García Culebras for their excellent technical assistance.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest.

Sub-objetivo 2.3

Estudio de la infección por *Besnoitia* spp. y detección del parásito en zonas donde la besnoitiosis bovina está presente.



ORIGINAL ARTICLE

The role of wild ruminants as reservoirs of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle

Gutiérrez-Expósito, D¹., Arnal, M.C²., Martínez-Durán, D²., Regidor-Cerrillo, J¹., Revilla, M²., Ortega-Mora, L.M¹., Fernández de Luco, D²., Jiménez-Meléndez, A¹., Calero-Bernal, R³., Habela Martínez-Estélez, M.A³., García-Bocanegra, I⁴., Arenas-Montes, A⁴., Álvarez-García, G^{1*}

¹SALUVET, Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040-Madrid, Spain.

²Animal Pathology Department, Faculty of Veterinary, University of Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013-Zaragoza, Spain.

³Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, University of Extremadura, 10071-Cáceres, Spain.

⁴Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, University of Córdoba-Agrifood Excellence International Campus (ceiA3), Córdoba, Spain.

*Corresponding author: Gema Álvarez García. Tel.: +34-913944095; fax: +34-913944098. E-mail address: gemaga@vet.ucm.es

ABSTRACT

Bovine besnoitiosis, a parasitic disease caused by *Besnoitia besnoiti*, has been reported mainly in beef cattle raised under extensive pastoral systems and is considered to be re-emerging in Western Europe. Horizontal transmission probably occurs either by means of blood sucking arthropods or as a consequence of direct contact between infected and non-infected cattle. However, the role that wild ruminants (e.g., red deer (*Cervus elaphus*) and roe deer (*Capreolus capreolus*)) may play in the parasite life cycle as putative reservoirs remains elusive. Thus, we investigated the presence of *Besnoitia* spp. infection in 2,608 wild ruminants located in areas where bovine besnoitiosis is present and identified the *Besnoitia* species detected. First, a serosurvey was conducted in red deer ($n = 309$), roe deer ($n = 417$), Pyrenean chamois (*Rupicapra p. pyrenaica*, $n = 383$) and Iberian wild goat (*Capra pyrenaica hispanica*, $n = 288$) from two areas of Aragon, northeastern Spain, where bovine besnoitiosis is endemic. Second, red deer ($n = 820$), roe deer ($n = 37$), fallow deer (*Dama dama*, $n = 166$), Iberian wild goat ($n = 86$) and European mouflon (*Ovis orientalis musimon*, $n = 102$) from southwestern Spain, where new outbreaks have recently been reported, were also sampled. The presence of *Besnoitia* spp.-specific antibodies was confirmed by western blot in one red deer and one roe deer from the Pyrenees, and *Besnoitia* spp. DNA was detected by ITS1-PCR in the seropositive red deer. *Besnoitia* genotyping based on 6 microsatellite (MS) analyses was carried out in red deer samples and compared with *B. besnoiti* genotypes from 7 *in vitro* isolates and 3 infected bovines, *B. tarandi* (1 isolate) and *B. bennetti* (from tissues of an infected donkey) for *Besnoitia* spp. assignation. Multilocus MS analysis of *B. besnoiti*, *B. tarandi* and *B. bennetti* showed specific genotypes for each species. A restricted genetic diversity with two genotypes by variation in a unique MS marker was revealed among the 7 *B. besnoiti* isolates. Incomplete *Besnoitia* spp. genotype of 3 MS markers from red deer samples entirely matched the *B. besnoiti* genotypes. Accordingly, this work gives clues for the presence of *B. besnoiti* infection in red deer from Western Europe. Further molecular genotyping is needed to confirm that red deer may act as an intermediate host of *B. besnoiti*, although the low prevalence rates that were found indicate that wild ruminant species do not pose a risk of transmitting the infection to cattle.

Keywords: *Besnoitia besnoiti*, *Besnoitia tarandi*, wild ruminants, serosurvey, microsatellite genotyping

Enviado a *Veterinary Parasitology*
Presentado en el III Congreso APICOWPLEXA, Edimburgo, Reino Unido, 2015.

1. Introduction

Genus *Besnoitia* belongs to the family Sarcocystidae and is included in the subfamily Toxoplasmatinae, together with the closely related protozoa *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* (Ellis et al., 2000). Four out of 10 *Besnoitia* species reported to date (*B. besnoiti*, *B. tarandi*, *B. bennetti* and *B. caprae*) infect ungulates (bovids, subarctic cervines, equids and goats, respectively), which act as intermediate hosts. *Besnoitia besnoiti* and *B. tarandi* were first reported in the beginning of the twentieth century (Besnoit and Robin, 1912; Hadween, 1922). *Besnoitia besnoiti* (reported in cattle and antelope) is widely distributed in Africa, Asia and southwestern Europe, where the disease is considered to be re-emergent (European Food Safety Authority, 2010). In contrast, *Besnoitia* spp. infections detected in several wild ruminant species were attributed to *B. tarandi* (reviewed by Leighton and Gajadhar, 2001). In particular, the disease has occasionally been reported in *Bovidae* (musk ox) as well as *Cervidae* species (reindeer, caribou and mule deer) from different subarctic regions from Alaska (USA) and Canada (Choquette et al., 1967; Wobeser, 1976; Lewis, 1989; Glover et al., 1990; Lewis, 1992; Ducrocq et al., 2012) and in reindeer in Scandinavia and Russia (Nikolaevskii, 1961; Rehlinger et al., 1981; Hilali et al., 1990; Dubey et al., 2004).

The disease caused by both *Besnoitia* species is chronic, debilitating and

characterized by the development of subcutaneous tissue cysts responsible for skin lesions such as hyperkeratosis and alopecia as well as ocular conjunctiva cysts (Alvarez-García et al. 2014). However, many biological and epidemiological aspects of both parasites remain obscure, including the complete life cycles, transmission routes and the possibility of interaction between sylvatic and *domestic life* cycles. Regarding *B. besnoiti*, domestic cats or an undetermined wild carnivore has been suggested to act as the definitive host, and wild ruminants have been postulated as putative reservoirs (Alvarez-García et al., 2013; Basso et al., 2011; Gutiérrez-Expósito et al., 2013; Olias et al., 2011). Indeed, in the Spanish Pyrenees, where bovine besnoitiosis is endemic (Gutiérrez-Expósito et al., 2014), specific antibodies against *Besnoitia* spp. in a red deer and a roe deer (Gutiérrez-Expósito et al., 2013), as well as a roe deer naturally infected with *Besnoitia* spp. (Fernández de Luco et al., 2000) were detected. Nevertheless, the role of wild ruminants as parasite reservoirs as well as the identity of the *Besnoitia* species circulating among European wild ruminant populations should be clarified. *Besnoitia besnoiti* and *B. tarandi* species seem to be separated geographically, according to previous reports (Olias et al., 2011) and cross-infections have never been described.

Studies on *Besnoitia* spp. genetic variability is a challenge because the genome is still not sequenced, and 61 exclusive nucleotide sequences are available in

databases. These sequences mainly correspond to Internal Transcribed Spacer 1 (ITS-1) and subunits ribosomal RNA sequences, which showed 99.6-100% identity in *Besnoitia* spp. species affecting large mammals (Ellis et al., 2000; Schares et al., 2009). A recent genetic tool based on microsatellite (MS) markers differentiated *B. besnoiti*, *B. tarandi* and *B. bennetti* species, and variations among four *B. besnoiti* isolates have also been described (Madubata et al., 2012).

The aim of the present work was to determine the spread of *Besnoitia* spp. infection in wild ruminants located in areas where bovine besnoitiosis is present and to determine whether these species may act as intermediate hosts of *B. besnoiti*. Thus, a wide serosurvey was carried out in areas where the disease is endemic (Gutiérrez-Expósito et al., 2014), and outbreaks of bovine besnoitiosis have recently been reported (Álvarez-García et al., 2013). Next, the presence of *Besnoitia* spp. was confirmed by PCR in a seropositive red deer, and genotyping of *Besnoitia* species was carried out by means of multilocus MS analysis.

2. Material and methods

2.1. Sampled areas

Mountainous areas where bovine besnoitiosis is traditionally endemic (areas A and B) and where new outbreaks have recently been reported (area C) were selected

for the study (Fig. 1). Area A covers the whole of the central Spanish Pyrenees (Huesca Province, Aragon), where an animal true prevalence rate was recently reported to be 50% in beef cattle (Gutiérrez-Expósito et al., 2014). Area B comprises a mountainous region located in the eastern foothills of the Iberian System (Maestrazgo of Teruel Province, Aragon) with 26% (342/1307) animal true prevalence rate in beef cattle (unpublished data). In these areas, beef cattle are usually kept indoors in late autumn and winter, whereas during the spring and summer, the beef cattle cohabit in communal pastures with wild ruminants and are exposed to blood-sucking arthropods such as tabanids. The representative wild ruminants in area A are red deer, roe deer and Pyrenean chamois, and in area B, the representative wild ruminants are roe deer and Iberian wild goats. In area C the disease is considered emerging due to new outbreaks in beef cattle herds during the last few years (EFSA, 2010; unpublished results). This region covers extensive semi-natural silvopastoral woodlands known as “dehesas”, as well as Mediterranean forest, where a mixture of different livestock species (beef cattle, sheep, goats and Iberian pigs) share habitat with several wild animal species (Gaspar et al., 2007). Moreover, this area is close to the Portuguese Alentejo region where bovine besnoitiosis is endemic (Franco and Borges, 1915; Waap et al., 2014). The most representative wild ruminant species in this

area are red deer, roe deer, fallow deer and mouflon.

2.2. Samples from wild ruminants

Red deer (*Cervus elaphus*, $n = 309$), roe deer (*Capreolus capreolus*, $n = 347$) and Pyrenean chamois (*Rupicapra p. pyrenaica*, $n = 383$) were sampled in area A, Iberian wild goat (*Capra pyrenaica hispanica*, $n = 288$) and

roe deer ($n = 70$) were sampled in area B, whereas red deer ($n = 820$), roe deer ($n = 37$), fallow deer (*Dama dama*, $n = 166$), Iberian wild goat ($n = 86$) and European mouflon (*Ovis orientalis musimon*, $n = 102$) were sampled in area C (Fig. 1). Sampling was biased towards the hunting season (from September to February), although several samples included in this study came from animals that were found dead.

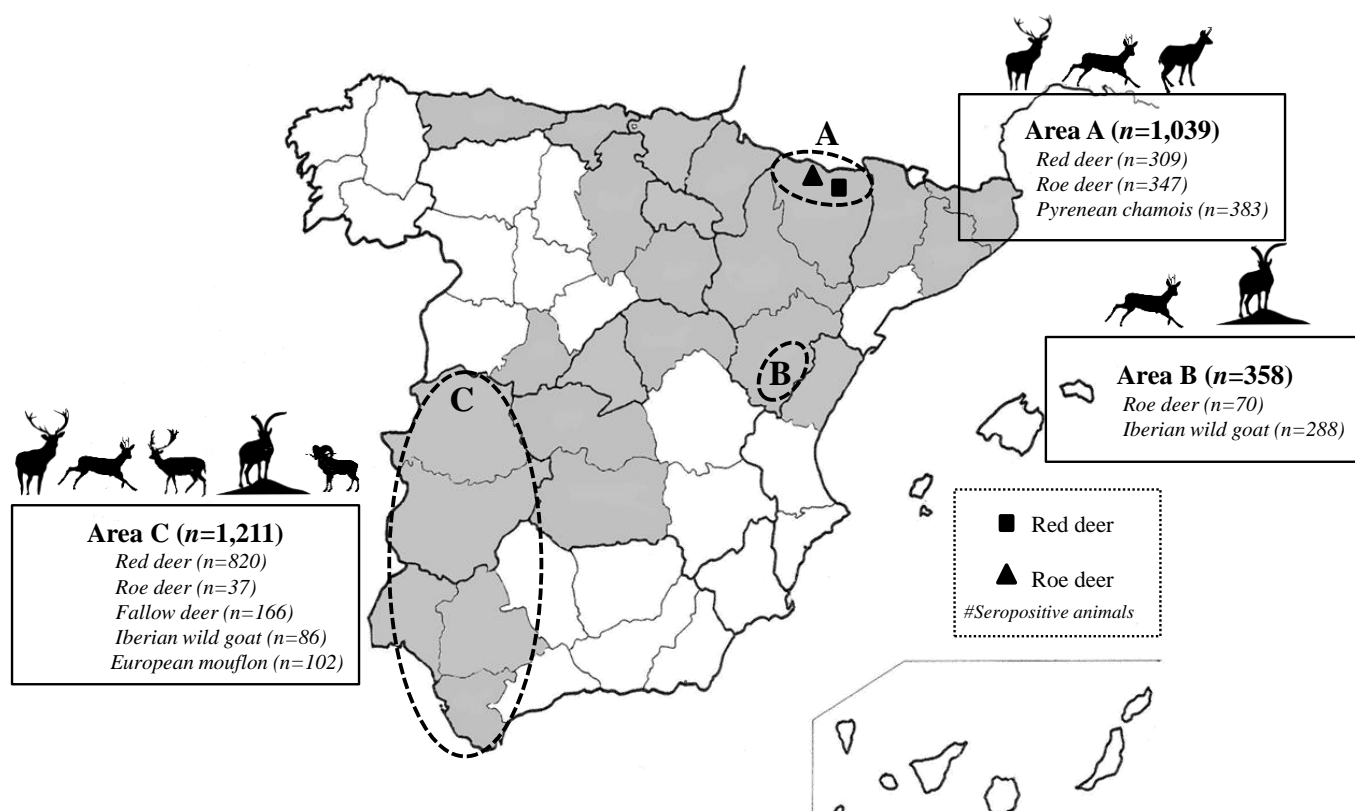


Figure 1: Geographical distribution of wild ruminants sampled in Spain. Sampled areas and seropositive animals. #Confirmed by western blot. Area A: Province of Huesca; Spanish Pyrenees. Area B: Maestrazgo, Province of Teruel. Area C: South Western Spain. *Provinces where bovine besnoitiosis has been reported are marked in gray (Alvarez-García et al., 2013; unpublished data).

Blood was collected in plastic tubes from the heart or the thoracic cavity, and serum was obtained after centrifugation and stored at -20°C analysis. Moreover, additional tissue samples conserved at -80°C from a few animals were also available. Age and sex data for the sampled animals were unavailable. All serum samples were first analyzed by ELISA, and subsequently, positive and doubtful results were confirmed by western blot (Gutiérrez-Expósito et al., 2013). Available tissue samples from western blot-positive animals were further analyzed by ITS-1 PCR to confirm the presence of the parasite, and positive samples were analyzed by MS genotyping. The tissue samples used were from (i) red deer: bronchus, nasal turbinate, sclera conjunctiva and subcutaneous lymph node; and (ii) roe deer: skin.

2.3. Parasites and cell culture

Bb Spain 1 isolate was propagated as a source of antigen for ELISA and western blot. Briefly, tachyzoites were grown in a Marc-145 cell monolayer with DMEM supplemented with 5% fetal calf serum, scraped from the cell culture flask after 72 hours post-inoculation and purified following a previously described procedure (Fernández-García et al., 2009b). Tachyzoites were counted using a Neubauer chamber, pelleted by centrifugation at 1350 *g* for 15 minutes at 4 °C and frozen at -80 °C until use.

2.4. Serology

Roe deer, red deer and fallow deer serum samples were analyzed by an in-house ELISA previously standardized for *Cervidae* species (100% sensitivity and 98% specificity) (Gutiérrez-Expósito et al., 2013). For Iberian wild goat, chamois and mouflon serum samples, a secondary antibody protein G (recombinant-peroxidase labeled, Sigma ®) was used at a dilution of 1:5000; the cutoff value was selected on the basis of three standard deviations of OD values obtained with seronegative sheep samples as previously described (Gutiérrez-Expósito et al., 2013). Then, tachyzoite-based western blot under non-reducing conditions was used to confirm *Besnoitia* spp. infection as previously described (García-Lunar et al., 2013a; Gutiérrez-Expósito et al., 2013), and the recognition of at least three bands in at least two of the three main antigenic areas described was considered as a positive result.

2.5. DNA extraction and ITS-1 PCR

Fifty milligrams of the homogenized tissue and pelleted parasites was used for DNA extraction as described (Frey et al., 2013). Briefly, nucleic acid extraction was carried out using the Maxwell® 16 FFPE Tissue Low-Elution Volume (LEV) DNA Purification Kit according to the manufacturer's instructions. In each run, a positive control, consisting of 50 mg of equally treated skin from a heavily infected

cow, and a negative control, consisting of water, were included. The DNA content of each sample was measured using a NanoPhotometer® (Implen, Munich, Germany) and adjusted to 50 ng/µl for further analysis. Tissue samples from western blot-positive animals were tested for the presence of parasite DNA by means of ITS-1 PCR, and the amplification product had an expected size of 231 base pairs (Cortes et al., 2007a). *Besnoitia besnoiti* ($n = 7$) and *B. tarandi* ($n = 1$) isolates maintained *in vitro* as well as biopsies from three heavily infected cattle and one donkey were also tested and subsequently included for molecular genotyping (Table 1).

2.6. Microsatellite genotyping

DNA samples used for genotyping were previously confirmed by ungulates to be *Besnoitia*-specific ITS-1 PCR (Cortes et al., 2007a) (Table 1). Consequently, *Besnoitia* spp. genotyping was performed by multilocus microsatellite analysis using the six MS loci with primers previously described (Madubata et al., 2012). In this study, amplification of MS for each sample was carried out in two batches of multiplex PCRs for the Bt-5, Bt-6, Bt-9 markers and the Bt-7, Bt-20, Bt-21 markers (Table 2). Each PCR reaction mixture contained 20 pmol of each primer,

2.5 µl 10x buffer and MgCl₂ 1.5 mM (Invitrogen), 11.8 µl molecular biology grade distilled water, 0.5 µl dNTPs (Sigma-Aldrich), 0.2 µl TAQ polymerase (Invitrogen), and 5 µl of DNA template, a total volume of 25 µl. Amplification was performed in a PTC-200 thermocycler (MJ Research). Samples were subjected to 1 cycle at 94°C for 5 min; 40 cycles of 94°C for 1 min, 58°C for 1 min, and 72°C for 1 min; and a final 72°C for 10 min.

The MS alleles amplified in each sample were determined by fragment size analysis and sequencing for assignation of the number of repeat motifs to each allele size. Alleles were recognized as peaks in the electropherogram, and the most dominant allele was selected. Forward primers 5'-labeled with 6-FAM, VIC or PET and unlabeled primers were used for fragment size analysis and sequencing, respectively (Applied Biosystems). PCR products were initially visualized in a 2% agarose gel and were subsequently processed to be either sequenced or analyzed (Table 1). For allele sizing, PCR products amplified with labeled primers were diluted in sterile distilled water to a concentration of approximately 1:10 – 1:20. Then, 13.75 µl of HiDi formamide and 0.25 µl of Gene Scan-500 (LIZ) Size Standards (Applied Biosystems) were added to 1 µl of each diluted PCR product.

Table 1. Genotyping of the different *Besnoitia* species and *Besnoitia besnoiti* isolates according to the number of repeat motifs in 6 microsatellite loci.

<i>Besnoitia</i> spp. samples analyzed	Species	Country	Microsatellite Genotype ^a						Reference
			MS-Bt-5	MS-Bt-6	MS-Bt-7 ^c	MS-Bt-9	MS-Bt-20	MS-Bt-21	
<i>B. tarandi</i>	Reindeer	Finland	11 ^b	12 ^b	8	11 ^b	11 ^b	24	Dubey et al., 2004
Bb-Israel	Cattle	Israel	10	12	8	10	8	13	Shkap et al., 1984
Bb-Ger1	Cattle	Germany	10 ^b	12 ^b	8	10 ^b	8 ^b	13 ^b	Schares et al., 2009
Isolates propagated in cell culture	Cattle	Italy	10	12	8	10	8	15 ^b	Frey et al., submitted
Bb-Evora03	Cattle	Portugal	10	12	8	10	8	13	Cortes et al., 2006
Bb-Spain 1	Cattle	Spain	10 ^b	12 ^b	8	10 ^b	8 ^b	13 ^b	Fernández-García et al., 2009
Bb-Spain 2	Cattle	Spain	10	12	8	10	8	13	Frey et al., submitted
Bb-France	Cattle	France	10	12	8	10	8	13	Liénard et al., 2011
Tissue samples									
Skin biopsy 1*	Cattle	Spain	10	12	8	10	8	13	This study
Skin biopsy 2*	Cattle	Spain	10	12	8	10	8	13	This study
Skin biopsy 3*	Cattle	Spain	10	12	8	10	8	13	This study
Scleral conjunctiva**	Donkey	USA	12	13	8	8	8	6 ^b	Ness et al., 2012
Lymph node*	Red deer	Spain	10	ND	ND	10	ND	13	This study

^a Microsatellite alleles were assigned according to size by fragment analysis.^b Microsatellite alleles analyzed by sequencing^c Number of repeat motifs assigned according to Madubata et al. (2012)* Skin biopsies 1 and 2 were taken in 2012 and 2014, respectively, from the same herd where Bb-Spain 1 was isolated. Skin biopsy 3 is from an outbreak in a *Besnoitia* -free area in central Spain in 2013. Tissue samples were stored at -80°C until analysis.** This sample was taken during the necropsy in an outbreak of besnoitiosis in donkeys previously described, and it was considered to be *B. bennettii* species.

Table 2. Primers employed in microsatellite analysis.

	Target	Primers	Primer size (bp)	Product size (bp)
Microsatellite sequences amplifications; Madubata et al. (2012)	PCR 1	Bt-5	UP*(FAM):AGAGACTCAATGAACCAAGC Rv: GTTATTCTCCTTTCCCCTTC	20 bp 20 bp 151 bp*
		Bt-6	UP* (VIC): GAGGTAGTCAGATTGGAACG Rv: GTCAATGAACTCGTGGATCT	20 bp 20 bp 238 bp*
		Bt-9	UP* (PET): GCTTTTATGATTGCTGGAAC Rv GTTGAATACGCGATCAATTT	20 bp 20 bp 163 bp*
		Bt-7	UP* (FAM): GTTTTCCTTTCCACATTTCG Rv GAGCAGAGAACGAGAAGCTA	19 bp 20 bp 151 bp*
		Bt-20	UP* (VIC): ACAAGAATTTGTGGATACCG Rv TCTAAATCGAGGCCATACCAT	20 bp 21 bp 240 bp*
		Bt-21	UP* (PET): GTGAAAGCTGCGATATAACC Rv ACACATTTCGCTTGGTTT	20 bp 18 bp 160 bp*

The size of fluorescent-dye-labeled PCR products for all of the MSs was determined using a 48-capillary 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with Gene Scan-500 (LIZ) Size Standards at the Unidad Genómica del Parque Científico de Madrid and the GeneMapper V 3.5 Software (Applied Biosystems) as previously described (Pedraza-Díaz et al., 2009).

For Sanger method sequencing, PCR products were purified by using the GENECLAN® Turbo Kit according to the manufacturer's instructions. Isolated DNA was sequenced with the Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and a 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems) at the Unidad Genómica del Parque Científico de Madrid. DNA sequences were analyzed in both directions using BioEdit Sequence Alignment Editor v. 7.0.1 (Copyright_ 1997–2004 Tom Hall, Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA, USA).

3. Results

3.1. Serology

Positive ELISA results were mostly under 2% in *Cervidae* species, where a 0.5% seroprevalence rate was found for both red deer and roe deer species. None of the fallow deer were seropositive. Seroprevalence rates in regions A, B and C were 1.1, 1.4 and 0.1%, respectively. In addition, 10.7% and 24.4% of the Iberian wild goats were seropositive by ELISA in areas B and C, respectively, and 6.5% Pyrenean chamois were seropositive in area A. None of the mouflon were seropositive. However, the presence of *Besnoitia* spp.-specific antibodies could be confirmed only by western blot in two animals: one roe deer and one red deer from the Pyrenees (area A) (Fig 1, Table 3).

3.2. Tissue samples and ITS-1 PCR

Exclusively lymph node of the seropositive red deer was PCR positive, whereas the skin of the seropositive roe deer was negative. Additionally, all *in vitro* isolates, cattle skin biopsies and sclera conjunctiva of the donkey were also positive.

3.3. Microsatellite analysis

The six MS markers evaluated were used to genotype *Besnoitia* spp. in 13 different samples (Table 1). All *Besnoitia* spp. samples were analyzed by fragment analysis, whereas only 5 out of 13 were sequenced to confirm the number of repeat motifs. Three different species (*B. besnoiti*, *B. tarandi* and *B. bennetti*) were clearly identified by differences observed in the MS size and number of repeat motifs (Table 1). However, it was not possible to sequence the MS Bt 7

marker, and the number of repeat motifs was assigned considering the MS size and repeat motifs assigned by Madubata et al. (2012).

B. tarandi differed from *B. besnoiti* isolates at MSs Bt-5, Bt-9, Bt-20 and Bt-21. In addition, *B. besnoiti* isolates differed from *B. bennetti* (sample from donkey) at MSs Bt-5, Bt-6, Bt-9 and Bt-21 (Table 1). Regarding intra-specific differences among the seven *B. besnoiti* isolates maintained *in vitro* and clinical samples from cattle, two different multilocus genotypes of *B. besnoiti* could be identified. These multilocus genotypes differed on the Bt-21 locus that discriminates the Bb Italy isolate from the other *B. besnoiti* isolates (Table 1).

MS analysis of the DNA sample from red deer could only be performed in MSs Bt-5, Bt-9 and Bt-21 by fragment analysis, which showed the same MS genotype as *B. besnoiti* isolates (Table 1).

Table 3. Detection of anti-*Besnoitia* spp.-specific antibodies in sera from wild ruminants

Species	Origin	n	ELISA		WB
			Doubtful (16≤RIPC≤37)	Positive (RIPC>37)	
Red deer (<i>Cervus elaphus</i>)	Area A	309	43	5	1/48
	Area C	820	34	1	0/35
	Total	1,129	77	6	1/83
Roe deer (<i>Capreolus capreolus</i>)	Area A	347	43	2	1/45
	Area B	70	2	1	0/3
	Area C	37	3	0	0/3
	Total	454	48	3	1/51
Fallow deer (<i>Dama dama</i>)	Area C	166	3	0	0/3
ELISA (OD>0.30)					
Iberian wild goat (<i>Capra pyrenaica hispanica</i>)	Area B	288	31		0/31
	Area C	86	21		0/21
	Total	374	52		0/52
European mouflon (<i>Ovis orientalis musimon</i>)	Area C	102	0		ND
Pyrenean chamois (<i>Rupicapra p. pirenaica</i>)	Area A	383	25		0/25
	Total	2,608	214		2/214

4. Discussion

Bovine besnoitiosis has continued to spread since the EFSA (2010) declared the disease as re-emergent in Southwestern Europe. Moreover, recently, the infection was reported to be highly prevalent in the Pyrenees, where cattle are raised under extensive pastoral systems and share habitats with *Besnoitia* spp. seropositive red deer and roe deer (Gutiérrez-Expósito et al., 2013; Gutiérrez-Expósito et al., 2014). In addition, new outbreaks of the disease have been reported in central and southwestern areas of Spain in the last few years (European Food Safety Authority, 2010; Fernández-García et al., 2010). However, the situation of the infection in wild ruminants and whether any of these species may act as parasite reservoirs and their role in the life cycle of the parasite remains unclear. Thus, a serosurvey was focused on two different scenarios of bovine besnoitiosis, and the most representative wild ruminant species were sampled. Two areas were studied in Aragon, northeastern Spain: one located in the central Pyrenees where the disease is traditionally endemic and the other in the Iberian System (The Maestrazgo) where besnoitiosis is more recently known. In addition, another area with dehesas located in southwestern Spain, where new outbreaks of bovine besnoitiosis have recently been reported, was also studied. Regarding the wild ruminant species sampled, apart from red deer, roe deer, Pyrenean chamois and European mouflon,

Iberian wild goat and fallow deer were studied for the first time. Iberian wild goat that lives in high- or mid-mountain habitats has been an expanding species since the 1980s in areas B and C, with an estimated census of 7,000 animals (Pérez et al., 2002). Fallow deer live in a wide range of habitats and can be found in most areas of Spain, although data are scarce about the census in Spain (www.magrama.es).

Red deer and roe deer were investigated in depth in areas where the disease is endemic. In a previous serosurvey carried out in hunted animals from different areas of Spain, where wild ruminants may cohabit with cattle, only 1 seropositive red deer and 1 seropositive roe deer were detected out of 77 and 50 animals, respectively (both were located in the eastern Pyrenees) (Gutiérrez-Expósito et al., 2013). In the present study, we notably increased the sample size and focused only on areas where the disease in cattle is present. Surprisingly, again, only one red deer and one roe deer from the central Pyrenees were seropositive, in agreement with the results obtained previously (Gutiérrez-Expósito et al., 2013). No specific antibodies against *Besnoitia* spp. were detected in area C. In this area, the disease has recently been reported due to animal trade from herds where bovine besnoitiosis is endemic. However, the presence of the infection in wild ruminant populations from area C should not be ruled out, considering that this area is in the vicinity of the Alentejo region (Portugal)

where bovine besnoitiosis is historically endemic (Waap et al., 2014). Thus, the low prevalence rates found evidenced that wild ruminants do not seem to play an important role in *B. besnoiti* transmission to cattle in Spain. Despite these results, remarkably, serological and molecular results support the hypothesis that red deer might act as intermediate hosts of *B. besnoiti*, proving the existence of interconnected *B. besnoiti* sylvatic and domestic life cycles. The current evidence regarding the absence of *Besnoitia*-specific antibodies in Iberian wild goat, fallow deer, Pyrenean chamois and European mouflon is that these wild ruminant species either do not act as a reservoir or are of limited importance. Similar results were previously reported in European mouflon ($n = 20$) and Pyrenean chamois ($n = 140$) from the eastern Spanish Pyrenees (Gutiérrez-Expósito et al., 2013). Nevertheless, these results do not discard these *Caprinae* species as potential hosts of other *Besnoitia* species. Indeed, the disease caused by *B. caprae* has been described in domestic goat (*Capra aegagrus hircus*) from Kenya, Nigeria and Iran, and wild goat (*Capra aegagrus aegagrus*) from Iran, but not in other parts of the world (Gutiérrez-Expósito et al., 2013; Oryan et al., 2014). ELISA-false-positive reactions detected herein may be due to cross-reactions with closely related parasites, as recently proved for ELISA false positive reactors in cattle (García-Lunar et al., accepted). Thus, a confirmatory technique such as western blot was used in the absence

of a more specific ELISA (Gutiérrez-Expósito et al., 2013).

This work describes for the first time a *Besnoitia* spp. infection in a red deer from Western Europe likely caused by *B. besnoiti*. *Besnoitia* spp. infection was reported in the past in a Spanish roe deer, although the parasite species was never elucidated (Fernández de Luco et al., 2000). Previous descriptions of besnoitiosis in wild ruminants from Europe have been reported exclusively in reindeer from subarctic areas of Sweden and Finland and were attributed to *B. tarandi* infection based on the parasitized host species, ultrastructure studies and non-discriminative molecular techniques (Dubey et al., 2004; Hilali et al., 1990).

In this sense, it was initially tempting to speculate that *Besnoitia* species circulating in Spanish wild ruminants might be *B. tarandi* as for other *Cervidae* species. Madubata et al. (2012) addressed the extent of genetic variation between *Besnoitia* spp. samples using different markers such as the ITS-1 region, the β subunit of RNA polymerase B (*rpoB*) and six MS loci. This previous work set the basis for the present study because this work distinguished specific genotypes for each *Besnoitia* species. Thus, MS genotyping was performed to elucidate which *Besnoitia* species was circulating among wild ruminants. Five of 6 MSs revealed inter-specific differences between *B. besnoiti*, *B. tarandi* and *B. bennetti* species, as previously described by Madubata et al. (2012). However, Madubata

et al. (2012) showed intra-specific variations among *B. besnoiti* isolates from Israel, Germany and Italy, whereas we found a limited genetic diversity between these isolates in this study, based on the variation of the MS Bt-21 marker between the Bb Italy isolate and the remaining isolates. All *B. besnoiti* isolates and 3 cattle skin biopsies, except for Bb Italy, showed the same MS genotype. Molecular differences can be explained by the methodology used, proven that PCR amplification may introduce repeat length variation prior to cloning. This limited genetic diversity in *B. besnoiti* may be explained by the origin of the isolate population analyzed, which is likely to be the same genotype because the recent outbreaks of the disease were due to animal trade from traditionally endemic areas of Europe such as the Pyrenees as well as different regions of France where the disease has already been present for several years.

Regarding *Besnoitia* spp. samples from red deer, MS genotyping was partially achieved, probably because of a low parasite burden. Nevertheless, the 3 MS markers amplified showed polymorphism among *Besnoitia* spp. and yielded results identical to the results obtained in *B. besnoiti* isolates. Unfortunately, molecular tools are still to be fully developed in the genus *Besnoitia*, so that genetic diversity intra- and inter-species in *Besnoitia* remains unrevealed to date. Thus, the existence of genetic variability should not be discarded. Therefore, new phylogenetic markers or genome

comparisons are required to confirm this distinction between *Besnoitia* species.

As *B. besnoiti* infection could happen in wild ruminants, the possibility of *B. tarandi* to infect cattle would need to be explored. Thus, cross-transmission experiments should be carried out to fully identify the host specificity of the *Besnoitia* species. Nevertheless, besnoitiosis might be a relevant disease for the wild caribou population as well as for the semi-domesticated reindeer in subarctic areas. In fact, besnoitiosis in reindeer causes economic losses to the meat industry (Dubey et al., 2004). In this sense, a prevalence of 47.6% of *B. tarandi* infection has recently been reported by the microscopic observation of tissue cysts in the wild caribou population in northern Quebec, Canada (Ducrocq et al., 2013), which might be contributing to the decline of caribou and reindeer populations across the Arctic Polar regions (Vors and Boyce, 2009). Thus, the existence of a bottleneck population postulated by Madubata et al. (2012) seems to be feasible, as it occurs for other pathogens that circulate in caribou populations. Unfortunately, a paucity of variation in the *B. tarandi* genome could not be proved in this work due to the analysis of only one isolate.

To conclude, red deer may act as an intermediate host of *B. besnoiti*, although further molecular genotyping is needed to confirm this finding. Moreover, the low prevalence rates found here indicate that the role of red deer and roe deer in the

epidemiology of bovine besnoitiosis is of limited importance in Spain and that they are not good sentinels of infection for *B. besnoiti* in cattle. The parasite transmission route in this animal remains to be elucidated, although either blood sucking arthropods, direct contact or a definitive host might be involved. Interestingly, MS analyses proved to be helpful in epidemiological studies to investigate the species of *Besnoitia* infections in ungulates. However, new phylogenetic markers are needed to clarify the genetic variability of the genus *Besnoitia*. In addition, further epidemiological studies following a similar approach focused on areas where the disease is endemic may help to look for other putative reservoirs, including intermediate as well as definitive hosts, in other regions or countries.

Acknowledgments

Part of this work was supported by a research project from the Spanish Ministry of

Science and Innovation (AGL 2010-20561), CYTED (Thematic Network 113RT0469 Protozoovac) and by the Community of Madrid (PLATESA S20137ABI-2906). Daniel Gutiérrez Expósito has been financially supported by the Ministry of Science and Innovation (grant no. BES-2011-043753). Alejandro Jiménez-Meléndez has been financially supported by the Ministry of Education (grant no. FPU13/05481). The Aragonese sampling was supported by the Aragon Government (Health monitoring on game species), and the authors acknowledge the dedicated assistance of the game rangers and hunters' societies from Aragon. We sincerely thank Sally Anne Ness and Thomas J. Divers for the provision of material of infected donkey. Finally, we also acknowledge Vanessa Navarro Lozano for her excellent technical assistance.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest.

Sub-objetivo 2.4

Descripción de un caso de besnoitiosis sistémica en un corzo ***Capreolus capreolus***



SHORT COMMUNICATION

Systemic besnoitiosis in a juvenile roe deer (*Capreolus capreolus*)

Arnal, M.C.^{1#}, Gutiérrez-Expósito, D.^{2#}, Martínez-Durán, D.¹, Regidor-Cerrillo, J.², Revilla, M.¹, Ortega-Mora, L.M.², Fernández de Luco, D.¹, Jiménez-Meléndez, A.², Álvarez-García, G.^{2*}

¹Animal Pathology Department, Faculty of Veterinary, University of Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013-Zaragoza, Spain

²SALUVET, Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040-Madrid, Spain.

Both authors contributed equally to this work

*Corresponding author: Gema Álvarez García. Tel.: +34-913944095; fax: +34-913944098. E-mail address: gemaga@vet.ucm.es

SUMMARY

Herein, we report the first incidence of systemic besnoitiosis in a male juvenile roe deer *Capreolus capreolus*. The animal was found dead in an area where bovine besnoitiosis is endemic and showed cachexia and multiple skin erosions in the metacarpal and metatarsal areas. Moreover, pinhead like structures suggestive of *Besnoitia* spp. tissue cysts were also present. Twenty-eight tissue samples from different locations were collected for microscopic lesion detection through histopathology and parasite detection using immunohistochemistry and PCR. In addition, the identity of *Besnoitia* spp. in PCR-positive tissue samples was also investigated using microsatellite markers and the comparison of protein disulfide isomerase gene sequences (*BbPDI*) of *B. besnoiti* and *B. tarandi* isolated from cattle and reindeer, respectively. *Besnoitia* cysts were detected in the skin (several parts), respiratory and upper digestive tracts, eyes, kidney, liver, testicle, cardiac muscle and lymphoid tissue. Remarkably, the presence of tissue cysts in the brain confirmed the capacity of *Besnoitia* spp. to form tissue cysts in the central nervous system (CNS). Finally, the *Besnoitia* species detected showed the same MS genotype as *B. besnoiti* and clustal analysis of *BbPDI* in samples obtained from roe deer and two *B. besnoiti* isolates were genetically identical. Thus, for the first time, there is evidence that roe deer might act as an intermediate host of *B. besnoiti*. Further molecular analyses and parasite isolations are needed to corroborate these findings.

Keywords: Roe deer, *Capreolus capreolus*, *Besnoitia besnoiti*, parasite distribution, genotyping, brain.

Besnoitia besnoiti and *B. tarandi* are the ethiologic agents of besnoitiosis in bovids and cervids, respectively, and have been geographically separated since their first description in the beginning of the XXth century (Besnoit and Robin, 1912; Hadwen, 1922). Indeed, *B. tarandi* has been reported in different subarctic regions of USA, Canada and Europe, whereas *B. besnoiti* is present in Africa, Asia and Europe and the disease in cattle is currently considered to be re-emergent in Western Europe (EFSA, 2010). This chronic and debilitating disease causes occasional deaths and is characterized by thickening of skin, accompanied by hyperkeratosis and alopecia and tissue cysts in the ocular conjunctiva and mucous membranes (Olias et al., 2011; Álvarez-García et al., 2014a). Thus, control measures are urgently needed. However, several epidemiological issues, such as the identification of a definitive host, routes of transmission and reservoirs, remain unclear in both species. Remarkably, two serosurveys conducted in wild ruminants in Spain have shown that red deer *Cervus elaphus* and roe deer *Capreolus capreolus* could be reservoirs of *Besnoitia* spp. (Gutiérrez-Expósito et al., 2013., submitted).

Herein, we reported a presumable *B. besnoiti* infection in a dead roe deer. Necropsy was performed and the lesions and parasite distribution were exhaustively studied for the first time. In addition, *Besnoitia* spp. was genotyped using microsatellite multilocus analyses and the

genetic variation of a unique, fully sequenced *B. besnoiti* gene (BbPDI) (Marcelino et al., 2011) was evaluated as a new genetic marker for discrimination between *B. besnoiti* and *B. tarandi*.

The animal (6-8-month-old male roe deer) was found dead in the Iberian System (Maestrazgo of Teruel, Aragon). In this area, bovine besnoitiosis is endemic (26% of animal true prevalence in beef cattle, unpublished data), and cattle share pastures with wild ruminants. A *Besnoitia* spp. infection was suspected due to pinhead-like structures in the ocular conjunctiva and skin lesions in the lips and lower legs. The roe deer was systematically necropsied, macroscopic lesions were annotated, and tissue samples were collected for histopathology, immunohistochemistry and PCR analysis (Table 1). In addition, blood samples were collected for serological analysis. Small pieces of tissue per sample were examined through direct microscopic examination. In addition, tissue sections were routinely stained with Hematoxylin-Eosin for histopathological analysis and the immunohistochemical labeling of parasites was performed using deparaffinized sections of the collected tissues. These procedures were previously described by Frey et al. (2013) and the number of observed tissue cysts was annotated (Table 1).

Table 1. Lesions and parasite distribution in tissues

Tissue samples		Lesions		Parasite detection		
		Macroscopic	Microscopic	CPS*	HP**	PCR
<i>Eye</i>	Parpebral conjunctiva	Hyperemia ^{PHL}	cysts	++	+++	+
	Ocular conjunctiva	Hyperemia ^{PHL}	cysts	++	+++	+
Skin	Limb	Thickening ^{PHL} and erosions		+++	+++	+
	Back	NF		+	++	+
	Ear	NF		Neg	+	+
	Eyelid	Skin thickening	cysts	+++	+++	+
<i>Respiratory tract</i>	Muzzle	Skin thickening	cysts	+++	+++	+
	Nasal turbinate	Hyperemia ^{PHL}	cysts	+++	+++	+
	Trachea	NF	cysts	+	+	+
	Lung	Hyperemia, edema	cysts	Neg	+	+
<i>Digestive tract</i>	Tongue	NF	cysts	+++	ND	+
	Hard palate	Thickening	cysts	+++	+++	+
	Intestine	NF	-	Neg	Neg	Neg
	Rumen	NF	-	Neg	Neg	+
<i>Lymphoid tissue</i>	Testicle L.n	NF		Neg	ND	+
	Mediastinum L.n	NF		+	+	+
	Retropharyngeal L.n	NF	cysts	+	++	+
	Mesenteric L.n	NF		Neg	Neg	Neg
	Subcutaneous L.n	Enlarged	cysts	++	+++	+
	Tonsils	NF		++	ND	+
	Spleen	NF		Neg	Neg	+
<i>Genital tract</i>	Testicle	NF	cysts	+	ND	+
	Epididymis	NF	cyst	ND	++	ND
<i>Others</i>	Kidney	NF	cysts	Neg	+	Neg
	Gluteal muscle	NF		+	+	+
	Bone marrow	NF		Neg	Neg	Neg
	Liver	NF	cysts	Neg	+	Neg
	Brain	NF	cysts	+	+++	+

Number of tissue cysts: (+; less than 5), (++; between 5 and 20), (+++; more than 20)

* A small piece of tissue (2-3mm³) per Compression Plates System (CPS) (Frey et al., 2013)

** A tissue section of 2cmx2cmx5µm per Histopathology (HP)

^{PHL} Pinhead-like structures

NF: Not found

ND: Not done

ITS-1 PCR (Cortes et al., 2007b; Frey et al., 2013) was also carried out to confirm the presence of the parasite in all collected tissues (tissues from the roe deer and a skin biopsy from a naturally infected donkey) and pelleted parasites of *B. tarandi*, Bb Evora03 and Bb Spain1 isolates (Dubey et al., 2004;

Cortes et al., 2006b; Fernández-García et al., 2009) maintained *in vitro*.

Genotyping was performed using two complementary techniques. First, the six MS loci were examined using previously described primers (Madubata et al., 2012) and the amplification of MS was performed as previously described (Gutiérrez-Expósito et

al., submitted). Second, the recently reported BbPDI gene was sequenced in *B. tarandi*, two *B. besnoiti* isolates (Bb Evora03 and Bb Spain1) and the *Besnoitia* spp. from the infected roe deer. BbPDI was amplified based on the BbPDI sequence (2758 bp, No. DQ490130) published in GenBank (Marcelino et al., 2011) using appropriate primers and 4 different sequential PCR reactions (Supplementary Figure). Each PCR reaction mixture contained 4 µl of each primer (10 µM), 5 µl of 10x buffer, MgCl₂ (2 mM), 23.6 µl of molecular biology grade distilled water, 1 µl dNTPs, 0.4 µl of TAQ polymerase (Bioline®, BIO-21060) and 10 µl of DNA template in a total volume of 50 µl. The PCR amplification was run on an Eppendorf Mastercycler Gradient® machine (Eppendorf, Hanover, Germany) at 94°C for 5 min, followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 64°C annealing for 1 min, and 72°C for 1.5 min, with a final extension step at 72°C for 10 min. The products from the BbPDI PCR amplifications were purified using the GENECLEAN® Turbo Kit according to the manufacturer's instructions. Isolated DNA was sequenced using the Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) and a 3730 DNA analyzer (Applied Biosystems) at the Unidad Genómica del Parque Científico de Madrid. The DNA sequences were analyzed in both directions. Clustal analysis of the DNA and amino acid sequences was performed using BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.1 (Copyright_ 1997–2004 Tom Hall, Ibis Therapeutics, Carlsbad,

CA, USA) and SIM (<<http://expasy.org/tools/sim-prot.html>>) (Huang and Miller, 1991), respectively.

The animal showed cachexia with a generalized serous atrophy and 10.75 kg body weight. The skin of metacarpal and metatarsal areas showed multiple erosions and was cracked and hard with mild thickening and hardening. The subcutaneous lymph nodes were enlarged. Pinhead-like structures suggestive of *Besnoitia* spp. tissue cysts were observed in the ocular and palpebral conjunctiva, nasal turbinates, inter-mandibular oral mucosa and the subcutaneous tissue of the distal part of the limbs (Table 1; Fig 1.A-B).

The histopathology revealed skin lesions showing orthokeratotic hyperkeratosis associated with several superficial dermal protozoal tissue cysts that visibly contained parasites, which were most numerous in affected epidermis. Tissue cysts also occurred with minimal or absent inflammatory response in the dermis and subcutaneous tissues. A low inflammatory reaction was observed in the mucosae of the oral and nasal cavities and in palpebral conjunctiva (Fig 1.C). The size of the tissue cysts located in the dermis, *lamina propria mucosae* (oral, nasal and conjunctival) and corneal stroma was large (150–200 µm). *Besnoitia* spp. tissue cysts detected in the brain were small (20–70 µm) (Fig 1.D-E) affecting the gray and white matter and occasionally these cysts were located in close proximity to vascular walls.

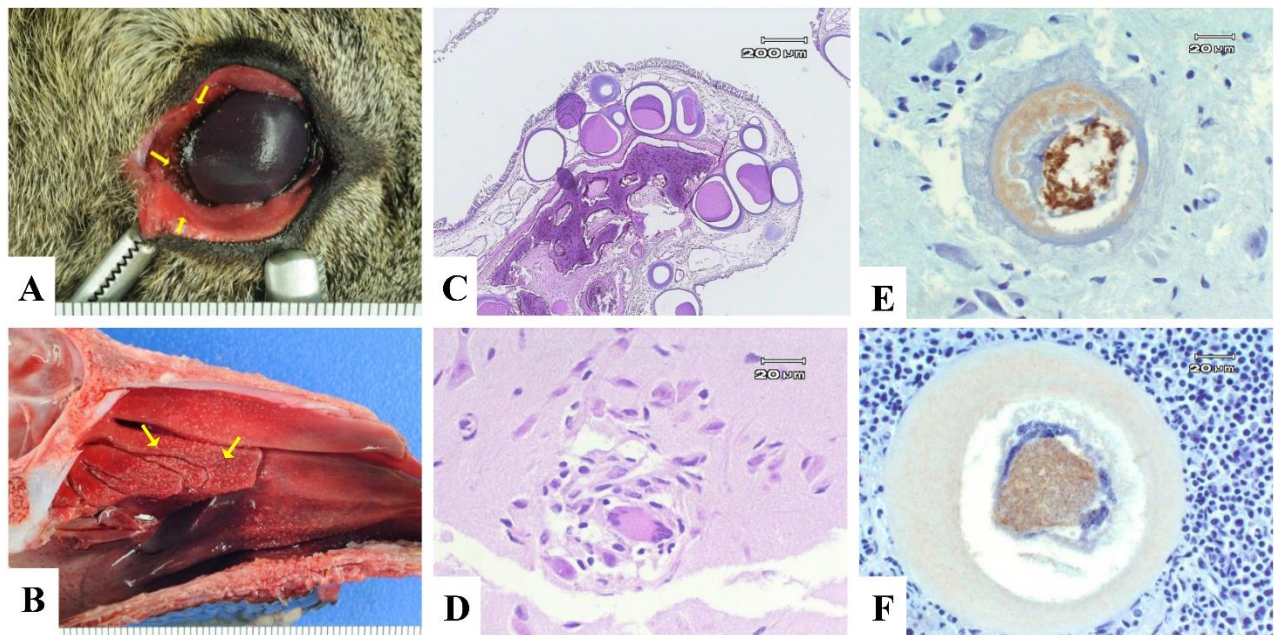


Figure 1: Macroscopic lesions. (A) Pinhead-like structures in the ocular conjunctiva and (B) nasal turbinates (yellow arrows). Histochemistry (H-E). *Besnoitia* spp. cysts in (C) turbinate mucosa and (D) cortex brain with multinucleate and inflammatory cells. Immunohistochemistry labeling of *Besnoitia* spp. in tissue cysts from (E) brain thalamus and (F) subcutaneous lymph node.

The brain cysts occurred with minimal or absent inflammatory cell reactions. These cysts were observed with few and small gliosis focus, affecting the thalamus, cerebral cortex and medulla oblongata, and the granular layer and peduncles of the cerebellum. Scattered tissue cysts were observed in other locations (Fig 1.F). Moreover, most tissue samples (22 out of 27) were PCR positive and the serum sample was seropositive by Western blot analysis (Gutiérrez-Expósito et al., 2013). Histological observations and PCR results are summarized in Table 1.

Regarding molecular findings, *Besnoitia* spp. detected in the roe deer showed the same MS pattern as the *B. besnoiti* isolate (BbSpain-1) at the six MSs (Supplementary Table). The coding region (1856 bp) of BbPDI (2758 bp) (Marcelino et

al., 2011) were completely sequenced for 3 *Besnoitia* spp. isolates (No. KU376314, No. KU376315 and No. KU376317) and *Besnoitia* spp. from roe deer (No. KU376316) (Supplementary Figure). The gene sequences from the roe deer sample and *B. besnoiti* isolates were genetically identical, whereas the *B. tarandi* isolate showed three polymorphisms. Two out of 3 polymorphisms were located in exons, but only changes in nucleotide position 754 resulted in an amino acid change (D→V) in the protein (Supplementary Figure).

In Western Europe, where bovine besnoitiosis is re-emerging, there is scarce data on besnoitiosis in wild ruminants (Alvarez-García et al., 2013). Thus, this work describes the first evidence of a systemic besnoitiosis in a juvenile roe deer in Spain. In addition, genotyping indicate that roe deer

may act as intermediate host of *B. besnoiti*. Recently, the detection of seropositive red and roe deer in the Spanish Pyrenees suggested a putative role of wild ruminants as parasite reservoirs of *B. besnoiti* for cattle (Gutiérrez-Expósito et al., 2013; submitted). Moreover, *Besnoitia* spp. was also detected using PCR in the lymph node of a seropositive red deer, and the genotyping results suggested *B. besnoiti* identity (Gutiérrez-Expósito et al., submitted). The remaining cases of *Besnoitia* spp. infection in wild ruminants (reindeer, caribou, mule deer and muskox) were reported in the sub-arctic regions and attributed to *B. tarandi*. (Nikolaevskii, 1961; Choquette et al., 1967; Rehinder et al., 1981; Glover et al., 1990; Dubey et al., 2004).

The clinical signs and lesions developed during the chronic stage of the disease and tissue cyst morphology and location were essentially the same ones reported for *Besnoitia* spp. infections in cattle and other wild ruminant species (Ayroud et al., 1995; Dubey et al., 2004; Álvarez-García et al., 2014a). *Besnoitia tarandi* tissue cysts were located in the skin, subcutaneous tissue, conjunctiva, sclera, periosteum of the long bones and the skull, muscle fascia, and occasionally in soft tissues. Similarly, *B. besnoiti* cysts were more frequently observed in skin, sclera, upper respiratory tract, testes and epididymis in males and in the *vestibulum vaginae* in females, regardless of the parasite burden (Kumi-Diaka et al., 1981; Frey et al., 2013). Interestingly, Basso et al.

(2013) observed that *B. besnoiti* was most frequently present in the distal tendons and fasciae of the hind limbs, consistent with the findings of Ducrocq et al. (2012), who showed the highest density of *B. tarandi* cysts in the skin of the metatarsus in caribou. The tissue cyst burden and location might vary according to the severity and the chronobiology of the infection, likely influenced by the parasite isolate. On the one hand, Basson et al. (1970) reported a wider tissue cyst distribution in severe infections. On the other hand, Bigalke et al. (1967b) reported that the *B. besnoiti* blue wildebeest strain was not virulent in cattle and showed viscerotropism, whereas the *B. besnoiti* bovine strain was virulent and showed dermatotropism.

In the present study, the highest tissue cyst burden was observed in the skin (legs and, lesser grade, eyelids and lips), corneal conjunctiva and upper respiratory tract, where parasite presence is restricted and parasite load is low in sub-clinically infected cattle (Frey et al., 2013). Most of the tissue cysts were under 200 µm, without any surrounding granulomatous response. These findings might indicate the rapid progression of the disease. Bigalke (1968) suggested that the infection age could be estimated based on the size of the tissue cysts. At 4-5 weeks post-infection, tissue cysts measuring more than 100 µm are typically developed, and mature cysts measure up to 390-410 µm at 71-77 days post-infection (Basson et al., 1970; Langenmayer et al., 2015a). However,

previous studies in both *Besnoitia* spp. infections agreed that viable tissue cysts might show variable host immune reactions as earlier as 14 days post-seroconversion, and these reactions might vary from an absent inflammatory response to an intense granulomatous response (Nobel et al., 1981; Langenmayer et al., 2015). Moreover, degenerated cysts were observed as early as 30 days post-infection (Basson et al., 1970) and are usually surrounded by a marked granulomatous response comprising neutrophils, macrophages, multinucleated giant cells, and fibrous tissue (Nobel et al., 1981, Glover et al., 1990, Frey et al., 2013). Surprisingly, degenerated tissue cysts were not observed in the present study. This finding might also support a rapid progression of the disease.

Remarkably, the presence of tissue cysts in the brain confirmed the capacity of *Besnoitia* spp. to form tissue cysts in the CNS similar to other closely related Toxoplasmatinae species (Dubey and Jones, 2008; Dubey and Schares, 2011). Moreover, Dubey et al. (2004) previously observed *B. tarandi* cysts in the brain of a 4-month-old reindeer with generalized besnoitiosis. In contrast, Basso et al. (2013) detected *B. besnoiti* DNA in brain of a chronically infected cow but remains unclear if that DNA detection comes from tissue cysts or extracellular zoites. Another interesting feature was the smaller size of these tissue cysts compared to those ones located in other tissues. A feasible explanation might be

that immune response could have limited cyst growth supported through the inflammatory response observed in the brain cortex. Indeed, Ayroud et al. (1995) observed small cerebral granulomas in a *Besnoitia*-infected reindeer, but no causative parasites were detected. As expected, the parasite was detected in more tissues using PCR compared with histopathology (Frey et al., 2013). Interestingly, the PCR positive result in rumen may be explained by the potential presence of *Besnoitia* spp. in any vascularized tissue and may be also associated to the severity of the disease (Basson et al., 1970).

Neither serology nor microscopic findings distinguish between *B. besnoiti* and *B. tarandi* (Alvarez-García et al., 2013). Thus, two different molecular approaches were performed and gave evidence for *B. besnoiti* identity. The genotyping study based on MS multilocus analysis supported *B. besnoiti* identity consistent with the recent description of *Besnoitia* spp. infection in a red deer from the Pyrenees (Supplementary table). Moreover, BbPDI sequences from *B. besnoiti* isolates and roe deer sample showed 100% genetic identity. Differences between *B. besnoiti* and *B. tarandi* were also observed confirming the MS results.

In summary, we reported systemic besnoitiosis in a juvenile male roe deer from a region where bovine besnoitiosis is endemic. The wide intra-organic distribution and high parasite load together with the small size of tissue cysts might indicate the severity and rapid progression of the disease.

However, clinical besnoitiosis in wild ruminants from areas where bovine besnoitiosis is present might be unusual according to the low seroprevalence rates observed in both species (Gutiérrez-Expósito et al., 2013; submitted). The disease situation in Spanish wild ruminants differs from besnoitiosis in subarctic regions, where high clinical prevalence rates were described in a caribou population from Canada (Ducrocq et al., 2012). However, we have demonstrated that the roe deer might act as an intermediate host of *B. besnoiti* and, consequently, the inter-connection between *B. besnoiti* domestic and sylvatic life cycles. Nevertheless, the parasite transmission route in the roe deer remains unknown and further molecular analyses and parasite isolations are needed to corroborate these findings.

Acknowledgments

Part of this work was financially supported through a research project from the Spanish Ministry of Science and

Innovation (AGL 2010-20561), CYTED (Thematic Network 113RT0469 Protozoovac) and the Community of Madrid (PLATESA S20137ABI-2906). The Aragon Government finances the health monitoring of game species, and the authors acknowledge the dedicated assistance of the game rangers and hunter societies from Aragon. Daniel Gutiérrez Expósito was financially supported through a grant from the Ministry of Science and Innovation (grant no. BES-2011-043753). Alejandro Jiménez-Meléndez has been financially supported by the Ministry of Education (grant no. FPU13/05481). The authors would like to thank Sally Anne Ness and Thomas J. Divers for the provision of infected donkey material. Moreover, we also acknowledge Carlos Diezma-Díaz for his excellent technical assistance.

Conflict of interest

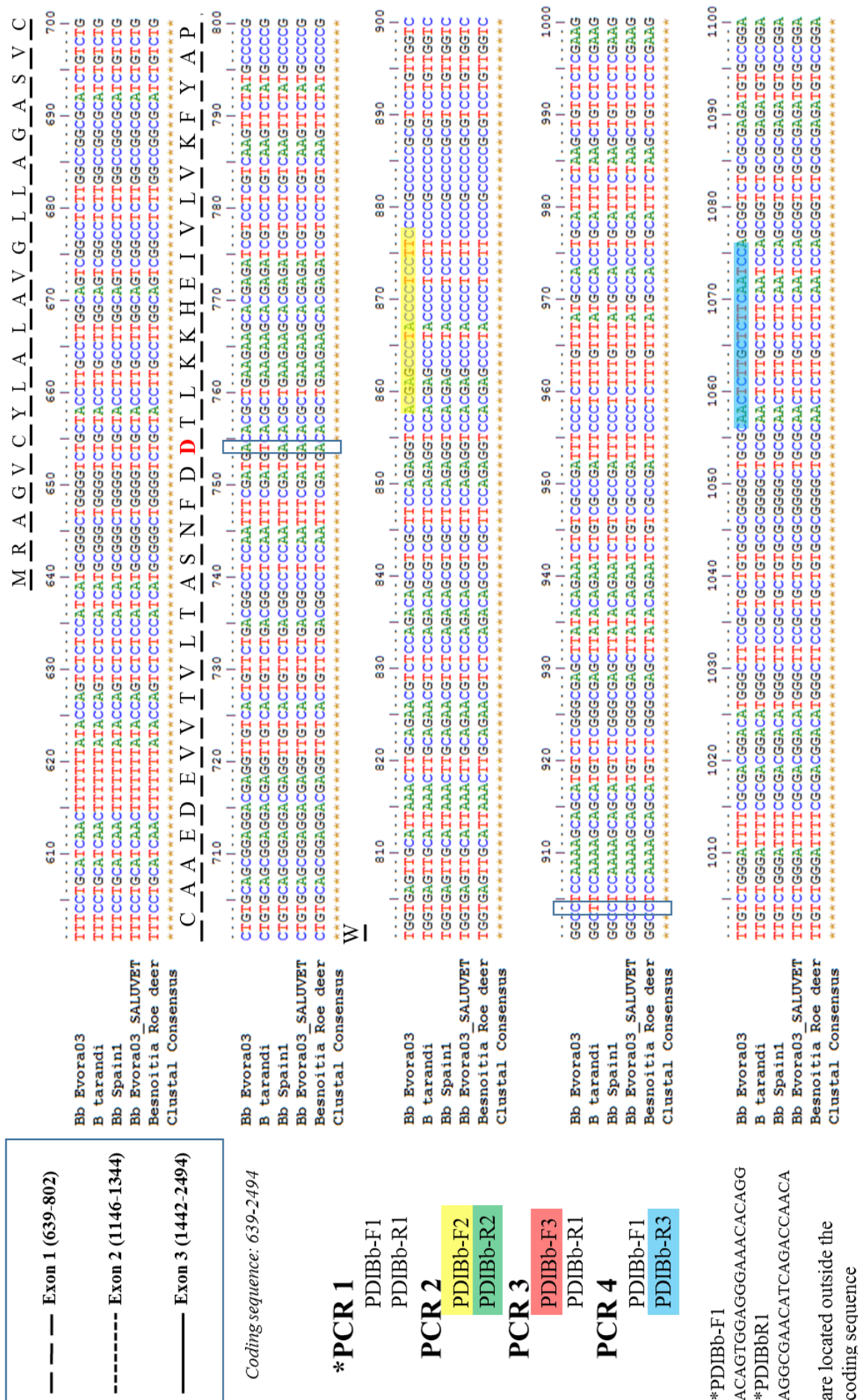
The authors have no conflicts of interest.

Supplementary Table. Genotyping of *Besnoitia* spp. from roe deer according to the number of repeat motifs in 6 microsatellite loci.

<i>Besnoitia</i> spp. samples analyzed	Species	Country	Microsatellite Genotype ^{a#}						Reference
			MS-Bt-5	MS-Bt-6	MS-Bt-7 ^c	MS-Bt-9	MS-Bt-20	MS-Bt-21	
<i>B. tarandi</i>	Reindeer	Finland	11 ^b	12 ^b	8	11 ^b	11 ^b	24	Dubey et al., 2004
<i>B. bennetti</i> *	Donkey	USA	12	13	8	8	8	6 ^b	Ness et al., 2012
Bb-Spain 1	Cattle	Spain	10 ^b	12 ^b	8	10 ^b	8 ^b	13 ^b	Fernández-García et al., 2009b
Nasal turbinate	Roe deer	Spain	10 ^b	12 ^b	8	10 ^b	8 ^b	13 ^b	This study

^aMicrosatellite alleles were assigned according to size by fragment analysis^bMicrosatellite alleles analyzed by sequencing as previously described (Cutiérrez-Expósito et al., submitted)^cNumber of repeat motifs assigned according to Madubata et al. (2012)* This sample (skin biopsy) was collected during the necropsy in an outbreak of besnoitiosis in donkeys previously described, and this species was regarded as *B. bennetti*.#The complete *B. besnoiti* genotype in the 6 MS confirmed the results of the genotyping of *Besnoitia* spp. from red deer Cutiérez-Expósito et al. (submitted).

Supplementary figure: Clustal analysis of BbPDI



Bb Evora03
B tarandi
Bb Spain1
Bb Evora03_SALUVE
Besnoitia Roe deer
Clustal Consensus

Bb Evora03
B tarandi
Bb Spain1
Bb Evora03_SALUVE
Besnoitia Roe deer
Clustal Consensus

Bb Evora03
B tarandi
Bb Spain1
Bb Evora03_SALUVE
Besnoitia Roe deer
Clustal Consensus

Bb Evora03
B tarandi
Bb Spain1
Bb Evora03_SALUVE
Besnoitia Roe deer
Clustal Consensus

A N E S R Q L G K F F V K Y D A P A E K I Y S L R Y E E G T D D F	1610	1620	1630	1640	1650	1660	1670	1680	1690	1700
.....										
G C C A A C G A A T C C C G C C A A C T T G G G A A G T T C T T C G T C A A G T A T G A C G C C C T C A G A G A A G A T C T A C T C C C T G G C T A C A G A G G G C A C T G C A G A C T T C A										
G C C A A C G A A T C C C G C C A A C T T G G G A A G T T C T T C G T C A A G T A T G A C G C C C T C A G A G A A G A T C T A C T C C C T G G C T A C A G A G G G C A C T G A C A C T T C A										
G C C A A C G A A T C C C G C C A A C T T G G G A A G T T C T T C G T C A A G T A T G A C G C C C T C A G A G A A G A T C T A C T C C C T G G C T A C A G A G G G C A C T G A C A C T T C A										
G C C A A C G A A T C C C G C C A A C T T G G G A A G T T C T T C G T C A A G T A T G A C G C C C T C A G A G A A G A T C T A C T C C C T G G C T A C A G A G G G C A C T G A C A C T T C A										
G C C A A C G A A T C C C G C C A A C T T G G G A A G T T C T T C G T C A A G T A T G A C G C C C T C A G A G A A G A T C T A C T C C C T G G C T A C A G A G G G C A C T G A C A C T T C A										
S G K T K D E L K K F V E T E S F P L L G P I N A E N F R K H I D R	1710	1720	1730	1740	1750	1760	1770	1780	1790	1800
.....										
G T G C A A G A C C A A G G A T G A G C T T A A G A A G T T C G T T G A G A C C G A G T C C T T C C C T G C T T G G C C C A T C A A C G C G A G A C T T C A G A A A G C A C A T C G A C C G										
G T G C A A G A C C A A G G A T G A G C T T A A G A A G T T C G T T G A G A C C G A G T C C T T C C C T G C T T G G C C C A T C A A C G C G A G A C T T C A G A A A G T A C A T C G A C C G										
G T G C A A G A C C A A G G A T G A G C T T A A G A A G T T C G T T G A G A C C G A G T C C T T C C C T G C T T G G C C C A T C A A C G C G A G A C T T C A G A A A G T A C A T C G A C C G										
G T G C A A G A C C A A G G A T G A G C T T A A G A A G T T C G T T G A G A C C G A G T C C T T C C C T G C T T G G C C C A T C A A C G C G A G A C T T C A G A A A G T A C A T C G A C C G										
G T G C A A G A C C A A G G A T G A G C T T A A G A A G T T C G T T G A G A C C G A G T C C T T C C C T G C T T G G C C C A T C A A C G C G A G A C T T C A G A A A G T A C A T C G A C C G										
D L D L V W L C G T E K D F D D S K A A V R E A A K K L R D T R S	1810	1820	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900
.....										
C G A C T G G A C C T T G T G G C T C T G C G C A C C G A A A G G A C T T C G A G A C T C T A A G G T G C C G T C C G T G A G C C C G A A A G A A G C T T C G T G A C A C C G C T C C										
C G A C T G G A C C T T G T G G C T C T G C G C A C C G A A A G G A C T T C G A G A C T C T A A G G T G C C G T C C G T G A G C C C G A A A G A A G C T T C G T G A C A C C G C T C C										
C G A C T G G A C C T T G T G G C T C T G C G C A C C G A A A G G A C T T C G A G A C T C T A A G G T G C C G T C C G T G A G C C C G A A A G A A G C T T C G T G A C A C C G C T C C										
C G A C T G G A C C T T G T G G C T C T G C G C A C C G A A A G G A C T T C G A G A C T C T A A G G T G C C G T C C G T G A G C C C G A A A G A A G C T T C G T G A C A C C G C T C C										
C G A C T G G A C C T T G T G G C T C T G C G C A C C G A A A G G A C T T C G A G A C T C T A A G G T G C C G T C C G T G A G C C C G A A A G A A G C T T C G T G A C A C C G C T C C										
F V W L D T D Q F K A H A E N A L G I T E F P G L V F Q G K K G R	1910	1920	1930	1940	1950	1960	1970	1980	1990	2000
.....										
T T C G T T G G C T C G A C A C T G A C C A G T T C A A G G C C C A T G C T G A G A A C G T T T G G T A T C A C C G A G T T C C C G G T C T T G T T C C A G G C A A A A G G A A G C G C T										
T T C G T T G G C T C G A C A C T G A C C A G T T C A A G G C C C A T G C T G A G A A C G T T T G G T A T C A C C G A G T T C C C G G T C T T G T T C C A G G C A A A A G G A A G C G C T										
T T C G T T G G C T C G A C A C T G A C C A G T T C A A G G C C C A T G C T G A G A A C G T T T G G T A T C A C C G A G T T C C C G G T C T T G T T C C A G G C A A A A G G A A G C G C T										
T T C G T T G G C T C G A C A C T G A C C A G T T C A A G G C C C A T G C T G A G A A C G T T T G G T A T C A C C G A G T T C C C G G T C T T G T T C C A G G C A A A A G G A A G C G C T										
T T C G T T G G C T C G A C A C T G A C C A G T T C A A G G C C C A T G C T G A G A A C G T T T G G T A T C A C C G A G T T C C C G G T C T T G T T C C A G G C A A A A G G A A G C G C T										
F V L P E A T T S L K D A S K I I K F F E D V D A G K I E R S L K S	2010	2020	2030	2040	2050	2060	2070	2080	2090	2100
.....										
T C G T C C T T C T G A A G C C A C C A C C T C T C T T A A G G A T G C T C C A A G A T C A T C A A G T T T T C G A G A T G T T A T G C T G G C A G A T C A G A G C G C T C T C T G A A A T C										
T C G T C C T T C T G A A G C C A C C A C C T C T C T T A A G G A T G C T C C A A G A T C A T C A A G T T T T C G A G A T G T T A T G C T G G C A G A T C A G A G C G C T C T C T G A A A T C										
T C G T C C T T C T G A A G C C A C C A C C T C T C T T A A G G A T G C T C C A A G A T C A T C A A G T T T T C G A G A T G T T A T G C T G G C A G A T C A G A G C G C T C T C T G A A A T C										
T C G T C C T T C T G A A G C C A C C A C C T C T C T T A A G G A T G C T C C A A G A T C A T C A A G T T T T C G A G A T G T T A T G C T G G C A G A T C A G A G C G C T C T C T G A A A T C										
T C G T C C T T C T G A A G C C A C C A C C T C T C T T A A G G A T G C T C C A A G A T C A T C A A G T T T T C G A G A T G T T A T G C T G G C A G A T C A G A G C G C T C T C T G A A A T C										

Bb Evora03
B tarandi
Bb Spain1
Bb Evora03_SALUVET
Besnoitia Roe deer
Clustal Consensus

Bb Evora03
B tarandi
Bb Spain1
Bb Evora03_SALUVET
Besnoitia Roe deer
Clustal Consensus

Bb Evora03
B tarandi
Bb Spain1
Bb Evora03_SALUVET
Besnoitia Roe deer
Clustal Consensus

Bb Evora03
B tarandi
Bb Spain1
Bb Evora03_SALUVET
Besnoitia Roe deer
Clustal Consensus

Bb Evora03
B tarandi
Bb Spain1
Bb Evora03_SALUVET
Besnoitia Roe deer
Clustal Consensus

[illegible]

Sub-objetivo 2.5

Primer estudio de la infección por *Besnoitia* spp. en pequeños rumiantes domésticos de España



SHORT COMMUNICATION

Absence of serological evidence for *Besnoitia* spp. infection in small domestic ruminants in Spain

Daniel Gutiérrez-Expósito¹, Luis Miguel Ortega-Mora¹, Ignasi Marco², Santiago Lavín², Javier Carvajal³, Angel Morales³, Gema Álvarez-García^{1*}

¹ SALUVET, Animal Health Department, Faculty of Veterinary Sciences, Complutense University of Madrid, Ciudad Universitaria s/n, 28040-Madrid, Spain.

² Servei d'Ecopatologia de Fauna Salvatge (SEFaS), Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193-Bellaterra, Spain.

³ Asociación Provincial de Agricultores y Ganaderos de Guadalajara (APAG), 19004-Guadalajara, Spain.

*Corresponding author: Gema Álvarez García. Tel.: +34-913944095; fax: +34-913944098. E-mail address: gemaga@vet.ucm.es

ABSTRACT

Besnoitia besnoiti and *B. caprae*, which infect bovines (cattle and antelope) and goats, respectively, are responsible for besnoitiosis, a chronic and debilitating disease characterized by skin lesions and pathognomonic tissue cysts in connective tissue, mucus membranes and conjunctiva. Bovine besnoitiosis is considered to be re-emerging in Central and Western Europe. In addition, *Besnoitia* spp. infection in Europe has been also reported in reindeer from Sweden and Finland and attributed to *B. tarandi*. Recently, the parasite was also detected in roe deer and red deer from Spain, where an inter-connection between *B. besnoiti* domestic and silvatic life cycles has been proven. In contrast, caprine besnoitiosis seems to be enzootic of Kenya and Iran. However, the presence of *Besnoitia* spp. in small domestic ruminants has never been explored in Europe and the role that might play in the epidemiology of bovine besnoitiosis as intermediate hosts or reservoirs of *B. besnoiti* remains unknown. Herein a first serosurvey was conducted in European sheep and goats from Spanish areas where bovine besnoitiosis is endemic. A convenience sampling was carried out in 518 sheep and 311 goats from 2 regions (the Pyrenees and Central Spain) where bovine besnoitiosis is endemic. Serum samples were first analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and next by a confirmatory Western blot. Specific antibodies were not found in any sampled animal. Thus, small ruminant species are unlikely to play a role in the epidemiology of bovine besnoitiosis, at least in the sampled regions. However, these species should be further studied in other European countries and/or regions with high census of sheep and goats where bovine besnoitiosis is spreading.

Keywords: *Besnoitia* spp., goat, sheep, Spain, serosurvey

The apicomplexan cyst forming species *Besnoitia besnoiti*, *B. tarandi*, *B. bennetti* and *B. caprae* infect bovines, cervids, equids and goats, respectively. Similar clinical signs, such as hyperkeratosis, alopecia and tissue cysts in mucus membranes, connective tissue and conjunctiva characterize besnoitiosis in these species (Alvarez-García et al., 2013). In Europe, bovine besnoitiosis has been traditionally endemic in the Portuguese Alentejo region and the Pyrenees for longer than one century (EFSA, 2010). Curiously, this cattle disease has recently attracted authorities' attention due to its re-emergence in Central and Western Europe (eg. Portugal, Spain, France, Italy and Germany) and ongoing expansion throughout several neighboring countries (Switzerland, Croatia, Hungary and Belgium) (EFSA, 2010, 2010; Basso et al., 2013; Beck et al., 2013; Hornok et al., 2014; Vanhoudth et al., 2015). Furthermore, it is known that *Besnoitia* spp. also circulates among red deer and roe deer, which share habitat with infected cattle, in Spain. Conversely, the infection was not detected in other wild ruminants such as mouflon, chamois, Spanish wild goat and fallow deer (Gutiérrez-Expósito et al., 2013; submitted). However, the presence of *Besnoitia* spp. in small domestic ruminants has never been explored in Europe. Remarkably, *B. besnoiti* is present in European countries with the highest census of sheep and goats (www.magrama.es). Caprine besnoitiosis

appears to be exclusively endemic in Kenya and Iran (Oryan et al., 2014), whilst there are no reports of the disease in sheep. Regarding *B. besnoiti* and *B. caprae*, gene sequences available up to date are identical for both species or only differ in one base insertion; thus, the use of the taxon *B. caprae* to describe the *Besnoitia* species found in goats was questioned (Ellis et al., 2000; Namazi et al., 2011). Nevertheless, cross-reactions between *B. besnoiti* and *B. tarandi* (Gutiérrez-Expósito et al., 2012) have allowed adapting the serological techniques standardized for cattle to Cervidae and Caprinae species by using *B. besnoiti* tachyzoites (Gutiérrez-Expósito et al., 2013).

We conducted the first serosurvey in small domestic ruminants in Spain in order to know whether they can act as intermediate hosts or reservoirs of *B. besnoiti*. Thus, *Besnoitia* spp. infection was studied in two regions where bovine besnoitiosis is present.

A total of 320 sheep and 311 goats located close to beef cattle herds were sampled in the Pyrenees (region A, 42°26'48"N, 1°57'10"E), where the 50% of beef cattle and 87.3% of the herds are infected (Gutiérrez-Expósito et al., 2014). Unfortunately, the data about the distance between herds and/or the use of communal pastures was not available. Additionally, a flock of 198 sheep was sampled in Central Spain (region B, 41°14'4"N, 3°14'47"W), where the first case of bovine besnoitiosis was reported in 2003 and nowadays the disease

has become endemic (Fernandez-García et al., 2010; García-Lunar et al., 2010). Remarkably, in this region sheep and beef cattle are raised under the same management measures and always pasture together. Herein, the experimental design used was the same as the employed in previous studies carried out in other ruminants' species. These studies showed that the seroprevalence in these species is very low (<0.2%) and *Besnoitia* spp. infection was limited to red deer and roe deer despite that more than 2000 serum samples from several regions where bovine besnoitiosis was present were tested (Gutiérrez-Expósito et al., submitted).

Blood samples were collected by jugular venipuncture and centrifuged at 290 x g for 15 min at 4 °C. Sera were frozen at -20 °C until tested. Age and sex data of the sampled animals were unavailable. Additionally, an exhaustive clinical inspection was conducted in region B looking for compatible clinical signs of chronic besnoitiosis (Alvarez-García et al., 2014).

Briefly, sera samples were first analyzed by an *in house* ELISA and positive results were confirmed *a posteriori* using a tachyzoite-based Western blot as previously described for wild Caprinae species (Gutiérrez-Expósito et al., 2013).

In the present study, we described for the first time the absence of specific anti-*Besnoitia* spp. antibodies in sheep and goats in Spain (Table 1). The ELISA test could not be accurately standardized due to the lack of

Table 1. Detection of anti-*Besnoitia* spp. specific antibodies in sera from small domestic ruminants.

	Specie	ELISA	WB
Region A	Sheep	17/320	0/17
	Goat	15/311	0/15
Region B	Sheep	37/198	0/37

an appropriate panel of reference sera. Thus, 8.3% of false-positive reactions were detected, which may be explained by the existence of cross-reactions with other closely related Sarcocystidae parasites (García-Lunar et al., 2015). In fact, *Sarcocystis* and *Toxoplasma gondii* are widely distributed in sheep and goats worldwide and *Neospora caninum* infection is more frequent than originally expected (Moreno et al., 2012; González-Warleta et al., 2014).

These preliminary results suggest an unlikely role of sheep and goats in the epidemiology of besnoitiosis in Spain. Particularly, the results obtained in sheep from region B discard the sheep as a parasite reservoir or an intermediate host due to the fact that cattle and sheep always share the same pastures and sheep never showed any clinical sign compatible with besnoitiosis. A natural host species related-resistance to *Besnoitia* spp. infection might explain this finding. As mentioned above, to our knowledge, there are no records of natural ovine besnoitiosis up to date and the disease was not experimentally reproduced (Pols, 1960). Moreover, little is known about the host specificity of the different *Besnoitia* species and their ability to infect other ruminants species has been scarcely

investigated (Pols, 1960; Bigalke, 1968). Another feasible explanation could be that transmission throughout blood-sucking arthropods (tabanids and/or *Stomoxys*) may be less frequent in sheep. In this sense, it has been shown that tabanids are attracted to large animals (e.g. cattle and horses) (Krcmar et al., 2006; 2014). In fact, Baldacchino et al. (2014) detected mainly cattle and red deer as source of blood meal for tabanids in the French Pyrenees instead of small ruminants (sheep, chamois, mouflon and roe deer).

On the contrary, we cannot rule out *Besnoitia* spp. infection in goats due to the low number of samples analyzed and the unknown distance between cattle herds and flocks. In addition, in contrast to sheep, *Besnoitia* spp. infections have been detected in domestic as well as wild goats (Cheema and Toofanian, 1979; Njenga et al., 1999). In the region A, a distance higher than 50 m between cattle herds and small domestic ruminant flocks difficult mechanical parasite transmission throughout tabanids (Barros and Foil, 2007). Moreover, similarly to sheep, bites of tabanids would be less frequent in goats (Krcmar et al., 2006).

On the other hand, *Besnoitia* spp. circulation between goats and cattle has been investigated in both natural and experimental infections and still remains to be clarified. First, during an outbreak of caprine besnoitiosis in Kenya, none of the 36 cows, which shared pastures with goats for 2 years, showed any sclera conjunctiva cysts (Bwangamoi et al., 1989). Additionally, 4

bulls inoculated with 20×10^9 *B. caprae* cysts by subcutaneous and intravenous routes did not show any clinical sign of the disease (Njenga et al., 1993). On the contrary, experimental infections of goats were successfully conducted with *B. besnoiti* infected rabbit blood by intravenous route (Pols, 1960). This finding might be indicative either of a higher virulence of *B. besnoiti* or *B. caprae* host specificity.

Finally, another route of parasite transmission in sheep and goats might occur through oocyst ingestion. Unfortunately, the identity of the definitive host is still a mystery (Olias et al., 2011) and whether it may be present in Spain is unknown (Millán et al., 2012).

In summary, the results of this work suggest that sheep and goats are not involved in *Besnoitia* spp. life cycle in Spain, at least in the sampled regions. However, given the re-emergence of the cattle disease in Europe, further studies in sheep and goats from other Southern European countries (eg. France and Italy) and regions (e.g. dehesas and Mediterranean forests) with high census of sheep and goats are needed. Furthermore, bovine besnoitiosis should be also explored in those regions where *B. caprae* is highly widespread.

Acknowledgements

This work was supported by a research project from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (AGL 2010-

20561). Daniel Gutiérrez Expósito has been financially supported by the Ministry of Economy and Competitiveness (grant no. BES-2011-043753). We wish to acknowledge Paula García-Lunar, Alba Pablos-Tanarro and Alejandro Jiménez-Meléndez for their excellent technical assistance and farmers of the herds for their help.

Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN GENERAL



La besnoitiosis bovina es una enfermedad parasitaria crónica y debilitante, producida por el protozoo apicomplejo *Besnoitia besnoiti*, que compromete las producciones y el bienestar animal dando lugar a infertilidad y esterilidad en los machos, lesiones cutáneas, deterioro de la condición corporal, abortos y muertes ocasionales (Álvarez-García et al., 2013). Actualmente, la besnoitiosis bovina está considerada como una enfermedad re-emergente en Europa debido al incremento en el número de casos y a su expansión geográfica en diferentes países durante las dos últimas décadas (Álvarez-García et al., 2013). Las claves de dicha re-emergencia no se conocen con seguridad, aunque el creciente movimiento intracomunitario de animales sin control sanitario previo podría haber favorecido la diseminación de la enfermedad. Hoy en día se desconocen muchos aspectos de la epidemiología que dificultan el control de la enfermedad, a lo que se añade la ausencia de tratamientos y vacunas eficaces. Por ello, la EFSA recomendó realizar estudios epidemiológicos en áreas donde la besnoitiosis es endémica en Europa con el fin de determinar la importancia real de la enfermedad en el ganado bovino europeo y esclarecer el papel de otras especies de rumiantes como posibles reservorios del parásito (EFSA, 2010).

Siguiendo estas recomendaciones, en la presente Tesis Doctoral se ha estudiado la epidemiología de la besnoitiosis bovina en España, abordándose algunas de las cuestiones previamente mencionadas. Concretamente, se han llevado a cabo estudios de prevalencia y dinámica de la infección o enfermedad en el ganado bovino localizado en zonas donde la enfermedad es endémica (los Pirineos y la Sierra de Urbasa-Andía, respectivamente) (objetivo 1). Asimismo, se ha estudiado el papel que pueden jugar los rumiantes silvestres y los pequeños rumiantes domésticos como reservorios u hospedadores intermediarios del parásito (objetivo 2).

Tras abordar el primer objetivo de la presente Tesis Doctoral se ha puesto de manifiesto que la enfermedad está ampliamente diseminada en el ganado bovino de carne. Además, las granjas infectadas presentan unas elevadas tasas de prevalencia e incidencia en ausencia de unas medidas de control adecuadas, así como un gran número de animales portadores de la enfermedad. Por un lado, el estudio incluido en el sub-objetivo 1.1 representa el primer estudio de seroprevalencia realizado en los Pirineos y en el que, a su vez, se muestrearon todos los sementales de una misma zona. Por otro lado, en el sub-objetivo 1.2 se describe, por primera vez, la dinámica de la infección evaluada durante un periodo de tiempo de 4 años en 3 explotaciones de carne donde la enfermedad es endémica (Sierra de Urbasa-Andía). En el sub-objetivo 1.1 se obtuvo una prevalencia individual del 50% tanto en hembras como en machos del Pirineo, incrementándose de forma significativa con la edad de los animales. Además, el 87,3% de las granjas estaban infectadas y la seroprevalencia intra-rebaño osciló entre el 15,1% y el 95,6%. En el sub-objetivo 1.2 se detectó un elevado número de casos nuevos anuales y la seroprevalencia intra-rebaño osciló entre el 35,6% y el 86,50%.

En comparación con otros estudios serológicos llevados a cabo en regiones españolas donde la enfermedad es endémica, los datos de seroprevalencia apoyan los obtenidos por Zacarías (2009), quien describió una seroprevalencia intra-rebaño superior al 30% en 9 de 13 granjas de aptitud cárnica localizadas en la Sierra de Urbasa-Andía. En relación a otros estudios realizados en otras regiones o países, debemos tener en cuenta la dificultad que existe para comparar los resultados obtenidos en los diferentes estudios de prevalencia, debido a la falta de uniformidad entre todos los trabajos en cuanto las prácticas de manejo, la zona muestreada, el diseño experimental y las técnicas serológicas empleadas. En regiones cercanas, como el Pirineo Francés, se desconoce la situación actual de la enfermedad, aunque se espera que sea parecida a la observada en España, ya que las condiciones medioambientales y las prácticas de manejo son similares a ambos lados de la cordillera. Curiosamente, al igual que ocurre en nuestro país, en otras regiones de Francia como los Alpes, el Macizo Central o la región PACA, la enfermedad podría considerarse como endémica dadas sus numerosas y periódicas descripciones (Alzieu et al., 2007), aunque no existan datos de seroprevalencia en ninguna de ellas. Para poder comparar los resultados de seroprevalencia obtenidos en zonas donde la enfermedad es endémica, debemos de fijarnos en los trabajos realizados en el ganado de carne de Israel y Sudáfrica durante la segunda mitad del siglo XX. La situación descrita entonces era similar a la que hoy en día se describe en España. Así, por ejemplo, en Israel varios autores registraron valores de seroprevalencia individual que oscilaron entre el 50% y el 66,9% (Neuman, 1972a; Frank, 1977; Golman y Pipano, 1983), mientras que en Sudáfrica, Janitschke et al. (1984) describieron tasas de seroprevalencia intra-rebaño que oscilaron entre el 38,1% y el 82,4%.

En contraposición a los resultados mencionados anteriormente, Waap et al. (2014) realizaron un estudio serológico transversal en Portugal con el fin de estudiar la distribución de la infección en el país localizando a la mayor parte de los animales infectados (320/355; 90,1%) en la región del Alentejo, donde la seroprevalencia individual fue del 5,1%. Llama la atención la baja tasa de seroprevalencia detectada en una zona considerada *a priori* como endémica en la que se muestrearon un elevado número de animales ($n=6283$). Además, la diseminación por el país luso es escasa, al contrario de lo observado en España o Francia. Este hallazgo podría deberse a las diferencias en las medidas de manejo (ganado bovino de dehesa frente a ganado bovino de montaña) o a un menor movimiento de animales. Asimismo, otros factores que podrían estar influyendo serían la ausencia del posible hospedador definitivo, el escaso contacto entre el ganado bovino y los posibles reservorios silvestres o a la diferente actividad de insectos picadores que favorecen la transmisión mecánica.

En relación a la prevalencia clínica intra-rebaño observada en la Sierra de Urbasa-Andía, ésta osciló entre el 45,2% y el 79,24% según la granja y el muestreo, siendo en todos los casos muy elevada, tratándose de una zona donde la enfermedad es endémica. De hecho, los resultados de

este trabajo contrastan con aquellos que señalan que la prevalencia clínica varía del 1% al 10% cuando la enfermedad es endémica y que la mayor parte de los animales son portadores asintomáticos (Pols, 1960; Jacquiet et al., 2010). Sin embargo, estos valores de prevalencia clínica no pueden explicarse solo por la presencia de diferentes factores de riesgo asociados a las medidas de manejo empleadas en estas granjas, sino también por la inspección clínica exhaustiva realizada. De hecho, Bigalke (1968) llegó a describir prevalencias clínicas cercanas al 50% en 2 granjas de Sudáfrica basándose en la presencia de quistes tisulares en la conjuntiva ocular, detectando en ocasiones un único quiste en un único ojo. En nuestro estudio, en el que se inspeccionó el vestíbulo vaginal por primera vez, los quistes tisulares en esta localización resultaron ser el signo clínico más frecuente. Cabe señalar, que a pesar de la elevada tasa de prevalencia clínica obtenida, la mayor parte de los animales infectados presentaban signos clínicos leves y difícilmente detectables (quistes tisulares en conjuntiva ocular o vestíbulo vaginal), denominados previamente por Bigalke (1968) como infecciones inaparentes. En este sentido, Frey et al. (2013) demostraron que los animales subclínicamente infectados no presentan signos clínicos detectables y su carga parasitaria es baja. Sin embargo, a pesar de ello, estos animales representan un riesgo para el resto de animales sanos con los que conviven ya que son reservorios del parásito. Asimismo, son los principales responsables de la aparición de nuevos brotes, ya que la introducción de estos animales en granjas libres de la enfermedad se lleva a cabo sin un control sanitario previo.

Además, se ha observado que en este tipo de granjas, donde la enfermedad es endémica, la seroprevalencia intra-rebaño se mantiene elevada a lo largo del tiempo y las tasas anuales de incidencia clínica (15%) y serológica (20%) son también elevadas si consideramos que, aproximadamente, el 50% del efectivo estaba infectado. La existencia de una premunición podría explicar esta elevada prevalencia de animales en presencia de una infección subclínica. Desafortunadamente, es difícil comparar este estudio con otros anteriores, ya que éstos son escasos, su diseño experimental fue distinto y no se estimó la tasa de incidencia, por lo que se desconoce el número de casos incidentes en cada muestreo. Además, la mayor parte de los estudios longitudinales disponibles en la literatura son, posiblemente, brotes, ya que se realizaron poco después de la detección de los primeros casos clínicos. En ellos, únicamente, se describió cómo varía la prevalencia en cada muestreo y en el caso de un brote, los valores de prevalencia varían en función del tiempo transcurrido tras los primeros casos, el cual se desconoce en la mayoría de las ocasiones. En general, la diseminación de la enfermedad dentro de una granja suele ser lenta (Pols, 1960) y los signos clínicos a menudo se confunden con otras enfermedades (Cortés et al., 2014). Sin embargo, los valores de prevalencia clínica y serológica pueden llegar al 40% y al 90%, respectivamente (Fernández-García et al., 2010). Así por ejemplo, Bigalke (1968) describió en Sudáfrica una prevalencia clínica del 16,3% tres años después de la entrada de un toro infectado a una granja libre de la enfermedad. En cuanto a Europa, en Portugal y Francia, Cortés et al (2006a)

y Genest (2008) observaron un incremento de la seroprevalencia intra-rebaño del 36% al 70% y del 35% al 52% en periodos de 1 año y medio y 4 años, respectivamente. Más recientemente, en el trabajo realizado por Liénard et al. (2011) en el Pirineo Francés, se describió un incremento de la seroprevalencia intra-rebaño del 30% al 89,5% en 14 meses en una población cerrada de 57 animales. En este mismo estudio, la prevalencia clínica basada en la presencia de quistes tisulares en la conjuntiva ocular aumentó del 10,5% al 22,8% en primavera y descendió del 21,05% al 8,7% en otoño. Las diferentes medidas de manejo (se trataba de una granja de leche), así como el tiempo transcurrido desde la entrada de la infección en la granja (desconocido), podrían explicar las diferencias observadas con nuestros resultados.

Las elevadas tasas de prevalencia observadas en el objetivo 1 se deben, principalmente, a las medidas de manejo que se realizan en explotaciones de ganado en extensivo, las cuales se consideran factores de riesgo para la transmisión de la enfermedad (p.ej. la monta natural y el uso de pastos comunales). De hecho, en el estudio longitudinal, las mayores tasas de prevalencia e incidencia se observaron en la granja que realizaba la compra de animales sin control sanitario previo y utilizaba la monta natural. Estas elevadas prevalencias contribuyen a la re-emergencia de la enfermedad, ya que muchos de los brotes descritos hasta el momento han surgido como consecuencia de la introducción en granjas libres de la enfermedad de animales subclínicamente infectados procedentes de zonas donde la enfermedad es endémica (p.ej. Francia) (Hornok et al., 2014; Vanhoudth et al., 2015). Además, el censo de ganado bovino de carne ha aumentado en los últimos años gracias a las ayudas de la PAC, mientras que el del ganado de leche ha descendido, haciendo que se incremente el comercio intracomunitario de animales, fundamentalmente, desde Francia con el fin de mejorar las razas bovinas autóctonas con sementales de las razas limusina y charolesa (Basso et al., 2013). Por todo ello, se debería diagnosticar la enfermedad precozmente e implantar un programa de control adecuado para así frenar su diseminación. Para ello, debemos tener presentes los factores de riesgo mencionados anteriormente y los principales modos de transmisión de la enfermedad.

Los dos modos de transmisión más relevantes hasta el momento son la transmisión por contacto directo (p.ej. monta natural) y la transmisión mecánica por medio de artrópodos hematófagos. La transmisión mediante contacto directo parece factible durante la monta natural, ya que los quistes tisulares subcutáneos se localizan muy superficialmente y pueden romperse fácilmente, por lo que el macho podría representar un riesgo de infección para las hembras y *viceversa* al liberarse los bradizoítos, los cuales son capaces de atravesar la mucosa (Bigalke, 1968). Teniendo en cuenta la elevada seroprevalencia de la infección en los sementales (50%), éstos podrían contribuir a su mantenimiento en la granja y a su diseminación cuando son introducidos en granjas libres. Además, existe un elevado riesgo de infección en los toros procedentes de zonas libres de la enfermedad que son introducidos en granjas donde la enfermedad es endémica

(Bigalke, 1968). A la vista del elevado número de casos incidentes anuales en estas granjas, estos valiosos sementales podrían infectarse y quedar estériles al cabo de poco tiempo, con las pérdidas económicas que ello supondría.

En cuanto a la transmisión mecánica por medio de artrópodos hematófagos (tábanos y *Stomoxys*), se ha demostrado que hace falta un elevado número de picaduras de un animal crónicamente infectado a uno sano para llegar a producir signos clínicos compatibles con la enfermedad (Bigalke, 1968). Algunos autores apoyan éste modo de transmisión por la coincidencia de un mayor número de casos clínicos en verano con el pico de máxima actividad de éstos insectos (Freudiger, 2008, Liérnard et al., 2011). Sin embargo, el periodo de monta natural en el ganado de carne de regiones montañosas en las cuales la besnoitiosis bovina es endémica comienza, aproximadamente, en los meses de mayo y junio, por lo que de ser infectados por contacto directo durante la monta los signos clínicos podrían empezar a observarse también en verano. En relación a los artrópodos hematófagos, en el sub-objetivo 1.2, se ha detectado, por primera vez, parasitemia en un animal crónicamente infectado. Por ello, el papel que juega la sangre como fuente de infección en la transmisión mecánica necesita ser estudiado, si bien el hecho de haber detectado parasitemia en tan sólo un animal sugiere un papel poco relevante de la misma, al menos durante la fase crónica de la enfermedad. En relación con este tema, se sabe que los taquizoítos pueden encontrarse extracelularmente durante la fase aguda de la enfermedad durante un corto periodo de tiempo (Bigalke, 1968), pero se desconoce la cinética de la parasitemia durante la fase crónica y si ésta tiene lugar como consecuencia de una reactivación o una re-infección. No obstante, la transmisión mecánica por medio de artrópodos hematófagos parece más probable mediante la inoculación de bradizoítos procedentes de quistes tisulares subcutáneos.

Otros factores de riesgo dependientes del animal como el sexo y la edad han sido valorados en el objetivo 1. Los resultados obtenidos apoyan los ya publicados por otros autores en los que los machos y las hembras presentan valores de seroprevalencia y prevalencia clínica similares, que aumentan gradualmente con la edad (Bigalke, 1968; Goldman y Pipano, 1983; Álvarez-García et al., 2014b). Otros autores apoyan la teoría de que los machos son más susceptibles que las hembras al desarrollo de signos clínicos y presentan además un mayor índice de mortalidad (Jacquet et al., 2010). No obstante, dichas observaciones podrían estar sesgadas, ya que al semental se le presta normalmente una mayor atención (Álvarez-García et al., 2014a). Respecto a la edad, se observaron los mayores valores de prevalencia (serológica y clínica) en animales mayores de 7 años en ambos estudios. Este aumento significativo de la prevalencia con la edad confirma de nuevo que la transmisión horizontal es el principal modo de transmisión entre animales enfermos y sanos (Bigalke, 1968; Fernández-García et al., 2010). Sin embargo, otros autores señalan una mayor prevalencia clínica en animales de 2 a 4 años, que desciende gradualmente hasta animales de 16 a 18 años (Freudiger, 2008). Este hecho implica que con el paso del tiempo los signos clínicos de los

animales infectados dejan de ser detectables durante la inspección clínica, aunque permanecen como portadores de la enfermedad (Frey et al., 2013). En relación a la raza, ésta no pudo ser valorada en este objetivo ya que más del 90% de los animales muestreados en ambos estudios pertenecían a las razas Parda Alpina o Pirenaica. No obstante, la raza no se considera un factor de riesgo para la infección por *B. besnoiti*, aunque algunos autores describen una mayor prevalencia de la infección o enfermedad en razas de ganado de carne que de leche (Bigalke, 1981; Freudiger, 2008). En este sentido, Álvarez-García et al. (2014b) observaron mayores tasas de seroprevalencia en 3 razas de aptitud cárnica (Rubia de Aquitania, Conjunto Mestizo y Pirenaica). Sin embargo, este hallazgo estuvo directamente relacionado con su ubicación (Sierra de Urbasa-Andía y los Pirineos) y las medidas de manejo utilizadas en estas zonas (monta natural y pastos comunales).

En lo que se refiere al diagnóstico, se pone de manifiesto la utilidad de la prueba ELISA para realizar estudios epidemiológicos, así como la necesidad de emplear el Western blot como técnica confirmatoria, tal y como previamente habían recomendado García-Lunar et al. (2013a). Sin embargo, las pruebas serológicas, y en concreto el ELISA, pueden dar lugar a falsos positivos debido a la existencia de reacciones cruzadas entre antígeno de *Besnoitia* spp. y anticuerpos específicos desarrollados frente a parásitos apicomplejos estrechamente relacionados como *Sarcocystis* spp. y *N. caninum* (García-Lunar et al., 2015) y falsos negativos donde los niveles de anticuerpos específicos descienden por debajo del punto de corte de la prueba diagnóstica (Fernández-García et al., 2010; Schares et al., 2010). En estos estudios no se detectaron falsos positivos, pero sí un número de falsos negativos mayor del esperado. En relación a los falsos negativos, en el sub-objetivo 1.2 se describió un 17% (33/191) de animales que aun presentando algún signo clínico compatible con la fase crónica de la enfermedad fueron seronegativos mediante ELISA y Western blot. Este mayor número del esperado, previamente descrito por otros autores en un bajo número de animales (Cortés et al., 2006c; Schares et al., 2011a; Ness et al., 2012), corrobora el hecho de que para llevar a cabo un diagnóstico certero es indispensable la combinación de la inspección clínica y el diagnóstico serológico, con el fin de detectar animales seronegativos con signos clínicos y animales seropositivos que no presenten ningún signo clínico detectable, respectivamente. Asimismo, la inspección clínica debe ser exhaustiva, buscando la presencia de quistes tisulares, principalmente, en la conjuntiva ocular y también en vestíbulo vaginal en el caso de las hembras. No obstante, a pesar de que la presencia de quistes tisulares en la conjuntiva ocular se considera patognomónica (Bigalke y Naude, 1962), un resultado positivo basado exclusivamente en la presencia de signos clínicos debe ser interpretado con cautela. Aunque la presencia del parásito debe comprobarse mediante diagnóstico laboratorio directo (Cortés et al., 2014), en granjas donde la enfermedad es endémica esto no siempre es posible. De hecho, Bigalke (1968) no detectó quistes tisulares en biopsias cutáneas en el 23,4% de los animales con quistes tisulares en la conjuntiva ocular. En estos animales, sería recomendable tomar biopsias

de varias localizaciones corporales, aunque tampoco se garantiza la detección del parásito, ya que la carga parasitaria es baja, obteniéndose con frecuencia resultados falsos negativos (Frey et al., 2013).

En resumen, cuando la enfermedad es endémica en una zona y no se establecen medidas adecuadas de control, las tasas de prevalencia e incidencia se mantienen elevadas. Sin embargo, los signos clínicos son leves y difícilmente detectables posiblemente por la existencia de premunición. Por ello, una herramienta indispensable dentro de las medidas de control de bioseguridad y biocontención es el diagnóstico, basado en una inspección clínica exhaustiva y en el uso del Western blot. De hecho, el seguimiento serológico, al menos anual, podría ayudar a detectar animales con infecciones subclínicas y que presentan oscilaciones de anticuerpos. Por otro lado, el movimiento de animales desde zonas donde la enfermedad es endémica a zonas libres supone un elevado riesgo de diseminación del parásito, ya que el porcentaje de animales portadores es elevado. Además, existe el riesgo de infertilidad o esterilidad en los machos introducidos por primera vez en una granja con besnoitiosis y que proceden de zonas libres de la enfermedad ya que, normalmente, contraen la enfermedad en un corto periodo de tiempo (Pols, 1960; datos no publicados). Por ello, se estima que las pérdidas económicas asociadas a la enfermedad pueden ser muy elevadas en base a los valores de prevalencia obtenidos. En esta situación, son necesarios estudios que cuantifiquen las pérdidas económicas asociadas a esta enfermedad para poder diseñar e implantar un adecuado programa de control basado en un análisis coste-beneficio. Además, se confirma la utilidad del protocolo de diagnóstico serológico para realizar estudios de prevalencia en otras zonas o países con el fin de detectar nuevos focos de la infección y valorar la relevancia de la enfermedad. En este sentido, Gentile et al. (2012) sugirieron la existencia de otras zonas en Europa donde la enfermedad podría ser endémica. De hecho, Fouquet (2009) y Gazzonis et al. (2014) han detectado ya nuevos focos de la infección en Francia (región PACA) e Italia (región de Lombardía), respectivamente.

En el segundo objetivo de la presente Tesis Doctoral se estudió la infección por *Besnoitia* spp. en otras especies de rumiantes relevantes en nuestro país, tanto silvestres como domésticas, que comparten hábitat con el ganado bovino en extensivo y que podrían actuar como hospedadores intermediarios o reservorios del parásito y, por tanto, facilitar el mantenimiento de la enfermedad. Los resultados demostraron la escasa relevancia que tienen los rumiantes silvestres y los pequeños rumiantes domésticos en la epidemiología de la besnoitiosis bovina en España, a pesar de confirmarse que tanto el ciervo como el corzo pueden ser hospedadores intermediarios de *B. besnoiti*. Para llevar a cabo este objetivo fue necesario, en primer lugar, adaptar las técnicas serológicas disponibles para el diagnóstico de la besnoitiosis bovina a otras especies de rumiantes (Cervidae y Caprinae) (sub-objetivo 2.1). Para ello, se estudiaron, inicialmente, las reacciones

cruzadas existentes entre *B. besnoiti* y *B. tarandi*, que parasitan al ganado bovino y a los rumiantes silvestres, respectivamente (Leighton y Gajadhar, 2001). Tal y como se esperaba, al enfrentar taquizoítos de *B. besnoiti* y *B. tarandi* a sueros positivos de caribú y ganado bovino, así como sueros hiperinmunes de conejo obtenidos frente a cada una de estas especies de *Besnoitia*, se obtuvo un patrón de reconocimiento de antígenos del taquizoíto homólogo y heterólogo idéntico para ambas especies mediante Western blot, detectándose 5 de las 6 bandas antigénicas inmunodominantes (46,3, 39,6, 37,1, 33,0 y 14,2 kDa) identificadas por Fernández-García et al. (2009a). Los títulos obtenidos mediante IFI difirieron en tan sólo una dilución para ambas especies. En este sentido, se ha corroborado, posteriormente, mediante técnicas proteómicas la dificultad para identificar proteínas específicas de especie con valor diagnóstico, ya que el proteoma y el inmunoma son muy similares en ambas especies (García-Lunar et al., 2014). En cuanto al resto de especies de *Besnoitia* que afectan a ungulados también se demostró la existencia de reacciones cruzadas entre *B. besnoiti* y *B. bennetti* mediante IFI y Western blot (Ness et al., 2012). Si bien se desconoce si existe reacción cruzada entre *B. besnoiti* y *B. caprae*, se esperan resultados similares a los obtenidos con *B. tarandi* y *B. bennetti*. Las especies de *Besnoitia* que afectan a ungulados presentan muchas similitudes (Álvarez-García et al., 2013). Concretamente, la similitudes moleculares han puesto en duda que *B. besnoiti* y *B. caprae* sean dos especies diferentes (Ellis et al., 2000). Por tanto, es posible emplear taquizoítos de *B. besnoiti* como antígeno en las diferentes técnicas serológicas para el diagnóstico de la besnoitiosis en otras especies de ungulados. Por otro lado, a diferencia de lo que ocurre en el ganado bovino, no se observaron reacciones cruzadas entre *Besnoitia* spp., *N. caninum* y *T. gondii* en los sueros de rumiantes silvestres (Shkap et al., 2002; García-Lunar et al., 2015), posiblemente porque los títulos obtenidos mediante IFI eran bajos ($\leq 1/100$). De hecho, en el diagnóstico de la besnoitiosis bovina las reacciones cruzadas con anticuerpos específicos frente a *N. caninum* o *Sarcocystis* spp. se detectan cuando los niveles de anticuerpos son elevados frente a ambas especies (García-Lunar et al., 2015). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en un estudio reciente en rumiantes silvestres en España, en el cual se detectaron bajas tasas de seroprevalencia (<13%) y bajos niveles de anticuerpos frente a *N. caninum* ($\leq 1/100$) y *T. gondii* ($\leq 1/800$) (San Miguel et al., aceptado).

En base a los resultados obtenidos mediante IFI y Western blot, se adaptó también la prueba ELISA empleada en el ganado bovino para especies pertenecientes a la Familia y Subfamilia Cervidae y Caprinae, respectivamente, utilizando antígeno soluble de *B. besnoiti* (sub-objetivo 2.2). Para las especies pertenecientes a la Familia Cervidae dicha prueba se estandarizó utilizando un panel de sueros de diversas especies de rumiantes silvestres de Canadá (el caribú, el wapití, el ciervo de cola blanca y el alce), previamente empleado en el sub-objetivo 2.1, obteniéndose valores elevados de Se y Esp. Para las especies de la Subfamilia Caprinae, la técnica se adaptó utilizando

como controles sueros de ganado bovino debido a la falta de un panel de sueros de referencia de pequeños rumiantes.

Los resultados han demostrado la utilidad del ELISA y el Western blot para realizar estudios serológicos en la fauna silvestre, así como para detectar la infección en rumiantes silvestres. Sin embargo, es necesario continuar con la estandarización de estas técnicas mediante el empleo de un panel de sueros de referencia más amplio que incluya otras especies de rumiantes. De hecho, se ha comprobado que al utilizar la prueba ELISA para especies de la Familia Cervidae, inicialmente estandarizada con un limitado panel de sueros procedentes de Canadá ($n=73$), en otra población de rumiantes silvestres y con un mayor número de muestras, el porcentaje de falsos positivos aumentó. En concreto, de los 21 animales seropositivos detectados mediante ELISA, solo 4 fueron confirmados por Western blot. Estos resultados indican que podría haber reacciones cruzadas con otros parásitos apicomplejos, no solo en especies de la Familia Cervidae sino también en aquellas de la Subfamilia Caprinae, tal y como se ha descrito para el diagnóstico de la besnoitiosis bovina (Gazzonis et al., 2014; García-Lunar et al., 2015).

En el objetivo 2 se llevaron a cabo 2 estudios de seroprevalencia en rumiantes silvestres. El protocolo de diagnóstico serológico fue el mismo que en los estudios de prevalencia y de dinámica de la infección realizados en el ganado bovino. Para ello, se empleó, en primer lugar, la prueba ELISA como técnica inicial de cribado serológico y, posteriormente, el Western blot como técnica confirmatoria (García-Lunar et al., 2013). En el primer estudio (sub-objetivo 2.2) se analizaron sueros de corzo, ciervo, rebeco y muflón ($n=1048$) procedentes de diferentes zonas de España donde conviven los rumiantes silvestres con el ganado bovino, confirmándose la infección mediante Western blot en un corzo y en un ciervo del Pirineo. En un segundo estudio (sub-objetivo 2.3), se incrementó el número de animales muestreados ($n=2608$) y se ampliaron las especies muestreadas, incluyéndose el gamo y la cabra montesa. Los animales procedían exclusivamente de zonas donde la besnoitiosis bovina estaba presente, ya fuera de forma endémica (noreste) o en forma de brotes (suroeste). Nuevamente, sólo un corzo y un ciervo fueron seropositivos, los cuales se localizaron también en el Pirineo. La escasa prevalencia de la infección por *Besnoitia* spp. obtenida en ambos estudios ($<0,2\%$) sugiere que estas especies juegan un papel poco relevante en la transmisión de la enfermedad al ganado bovino y, por lo tanto, no pueden considerarse buenos centinelas de la infección. Estos resultados contrastan con el papel que juegan estas especies en nuestro país en la epidemiología de otras enfermedades relevantes del ganado bovino, donde actúan como indicador biológico de la presencia o ausencia de diversos patógenos (p. ej. el virus de la lengua azul) o constituyen un riesgo de infección para el ganado bovino, como en el caso de la tuberculosis (Rodríguez-Sánchez et al., 2010; Gortázar et al., 2011). Esta baja casuística de la infección por *Besnoitia* spp. en rumiantes silvestres europeos (Hilali et al., 1990; Dubey et al., 2004; Fernández de Luco et al., 2000) contrasta con la observada en otras

regiones como en Canadá, donde se han descrito prevalencias clínicas cercanas al 50% en poblaciones de caribú, basadas en la presencia de quistes tisulares en la piel del carpo (Ducrocq et al., 2012).

En España, de las 6 especies de rumiantes silvestres muestreadas solo se confirmó la infección por *Besnoitia* spp. en el ciervo y en el corzo, si bien no debe descartarse su presencia en el gamo, el muflón, la cabra montesa y el rebeco. Los resultados negativos en estas especies pueden deberse al bajo número de muestras analizadas, al hábitat y a la distribución geográfica de cada una de ellas. En el caso del gamo ($n=166$) y el muflón ($n=122$), la mayor parte de las muestras procedían de zonas donde la besnoitiosis bovina está presente en forma de brotes. Por el contrario, las muestras de cabra montesa ($n=374$) y rebeco ($n=553$) procedían de regiones donde la besnoitiosis bovina es endémica casi en su totalidad. Sin embargo, estas especies se encuentran con más frecuencia a mayor altitud que el ganado bovino, por lo que el contacto es más improbable que en el caso del gamo, el muflón, el corzo o el ciervo. Además, en un estudio reciente sobre el comportamiento alimenticio de los tábanos en el Pirineo Frances, se ha demostrado la preferencia de éstos por los grandes mamíferos (p.ej. ganado bovino y ciervo) (Baldacchino et al., 2014). No obstante, sería recomendable llevar a cabo otros estudios con diseños experimentales similares en la fauna silvestre de otros países o regiones europeas. Esto ayudaría a conocer la situación de la infección en otras poblaciones de rumiantes silvestres o incluso en otras especies animales que puedan estar actuando como hospedadores o reservorios y cuyo papel aún no se ha estudiado (p.ej. Murinae, Mustelidae, Leporidae, Sciuridae o Talpidae). En este sentido, las especies de carnívoros silvestres que fueron seronegativas en un estudio anterior deberían ser muestreadas en aquellas zonas donde la besnoitiosis bovina sea endémica antes de descartarlas como posibles hospedadores o reservorios del parásito (Millán et al., 2012).

A pesar de los bajos valores de seroprevalencia detectados en el ciervo y en el corzo se confirmó la presencia del parásito en ambas especies mediante observación microscópica de los quistes tisulares o PCR (región ITS-1) en diferentes tejidos. Dado que la besnoitiosis en cérvidos (reno, caribú y ciervo mula) siempre ha sido atribuida a *B. tarandi*, y ésta nunca ha sido notificada en zonas donde *B. besnoiti* está presente (Olias et al., 2011), se decidió utilizar dos abordajes moleculares con el fin de esclarecer qué especie de *Besnoitia* circula entre los rumiantes silvestres en España. Los resultados indican que la especie detectada tanto en ciervo como en corzo podría ser *B. besnoiti*. En primer lugar, se hizo un genotipado mediante el análisis de microsatélites en el cual cinco de los 6 microsatélites empleados presentaron diferencias inter-específicas entre *B. besnoiti*, *B. tarandi* y *B. bennetti*. Se realizó un genotipado parcial de la muestra de ciervo procedente de un linfonódulo subcutáneo, siendo los 3 microsatélites analizados iguales a *B. besnoiti*, mientras que en la muestra de corzo procedente de cornete nasal los 6 microsatélites fueron idénticos al resto de genotipos de *B. besnoiti*. En relación a las diferencias intra-específicas,

Madubata et al. (2012) describieron diferencias en 4 microsatélites entre 4 aislados diferentes de *B. besnoiti* procedentes de Israel, Alemania e Italia mientras que nuestros resultados solo detectaron diferencias en uno de los 11 genotipos de *B. besnoiti* (Bb-Italy), que difirió únicamente en uno de los 6 microsatélites. Las diferencias observadas entre ambos estudios usando la misma técnica molecular pueden explicarse por la metodología empleada, ya que la amplificación de las secuencias de los microsatélites mediante PCR puede introducir repeticiones de longitud variable antes del clonaje. En segundo lugar, con el fin de corroborar los resultados anteriores, se abordó la utilidad de la región codificante de la PDI (BbPDI) (Marcelino et al., 2011) como marcador filogenético para diferenciar entre *B. besnoiti* y *B. tarandi*. Desafortunadamente, la muestra de ADN procedente del ciervo no tuvo la calidad suficiente y no pudo ser empleada en éste segundo abordaje. Sin embargo, las secuencias de los aislados de *B. besnoiti* procedentes de España (Bb-Spain 1), Portugal (Bb-Evora03) (Fernández-García et al., 2009b; Cortés et al., 2006b) y el aislado de corzo presentaron un 100% de identidad entre sí. Al ser comparadas con la secuencia de *B. tarandi* (Dubey et al., 2004), éstas presentaron 3 diferencias en 3 nucleótidos dando lugar una de ellas al cambio en un aminoácido de la secuencia de la proteína. A pesar de las limitaciones existentes en ambos abordajes, los hallazgos moleculares indican que posiblemente haya una escasa variabilidad genética entre los diferentes aislados de *B. besnoiti*, que puede deberse al origen común de los aislados de la población analizada, ya que proceden en su gran mayoría de zonas donde la enfermedad es endémica (Los Pirineos y la región del Alentejo). Por ello, a la vista de éstos resultados, se necesita descubrir nuevos marcadores filogenéticos y comparar el genoma de distintas especies o aislados para así confirmar la distinción entre especies o aislados de *Besnoitia* spp. que afectan a ungulados.

Con el objetivo de completar los estudios realizados en rumiantes silvestres, finalmente, hemos descrito en profundidad el primer caso de besnoitiosis sistémica en un corzo. En el sub-objetivo 2.4, se estudiaron las lesiones macroscópicas y microscópicas así como la distribución intra-orgánica del parásito en un corzo macho de 6 a 8 meses de edad hallado muerto en la zona del Maestrazgo (Teruel) en el año 2009. No obstante, la detección de *Besnoitia* spp. en el corzo ya había sido descrita por Fernández de Luco et al. (2000) en el Pirineo mediante la observación directa de quistes tisulares en conjuntiva ocular y piel. Desde entonces no se han vuelto a registrar más casos de la enfermedad en rumiantes silvestres europeos, a excepción de 19 renos procedentes del norte de Finlandia entre los años 1999 y 2004, infectados por *B. tarandi* (Dubey et al., 2004).

Tanto las lesiones encontradas (macroscópicas y microscópicas), como la distribución intra-orgánica del parásito fueron similares a las descritas en otros ungulados (Álvarez-García et al., 2013). El animal presentaba una mala condición corporal, así como la piel agrietada y engrosada en varias zonas de la cabeza y las extremidades. El análisis histopatológico posterior reveló una dermatitis hiperqueratósica asociada a la presencia de multitud de quistes tisulares del parásito.

Los quistes tisulares de *Besnoitia* presentaban una amplia distribución intra-orgánica, localizándose en el aparato respiratorio, el reproductivo, el digestivo superior, la piel (varias regiones), los ojos, el sistema nervioso central, los riñones, el hígado y el sistema linfático. La mayor cantidad de quistes tisulares se detectó en la piel (extremidades y en menor medida en los párpados y en los labios), la conjuntiva corneal y el aparato respiratorio superior. Curiosamente, es en estas localizaciones donde se ha detectado únicamente al parásito en el ganado bovino subclínicamente infectado (Frey et al., 2013).

Uno de los hallazgos más relevantes fue el pequeño tamaño de los quistes tisulares ($\leq 200 \mu\text{m}$). En este sentido, Bigalke (1968) sugirió que la cronobiología de la infección puede estimarse según el diámetro de los quistes tisulares. A los 30-37 dpi, los quistes tisulares miden más de $100 \mu\text{m}$, mientras que a los 71-77 dpi pueden llegar a alcanzar un tamaño de $390-410 \mu\text{m}$ (Basson et al., 1970; Langenmayer et al., 2015a). En comparación con otros casos en los que la enfermedad progresó rápidamente, Dubey et al. (2013) describieron quistes tisulares de 10 a $70 \mu\text{m}$ de diámetro en un toro con una infección natural que murió 21 días después de la aparición de los primeros signos clínicos, sin apenas observarse respuesta inmunitaria alrededor del quiste. En relación a dicha respuesta inmunitaria, estudios previos llevados a cabo en diferentes infecciones del género *Besnoitia* han descrito una respuesta inmunitaria variable alrededor del quiste que puede empezar a observarse a los 14 días post-seroconversión y que varía desde ausente hasta un intenso infiltrado de origen granulomatoso (Nobel et al., 1981; Langenmayer et al., 2015a). Además, pasados 30 dpi pueden empezar a observarse quistes degenerados (Basson et al., 1970), los cuales están rodeados de una intensa respuesta inmunitaria formada por neutrófilos, macrófagos, células multinucleadas y tejido fibroso (Nobel et al., 1981, Glover et al., 1990, Frey et al., 2013). En este estudio, la elevada carga parasitaria, la extensa localización de los quistes tisulares, su pequeño tamaño y la ausencia de quistes tisulares degenerados podrían indicar una progresión rápida de la enfermedad que podría haber contribuido a la muerte del animal. No obstante, no pudo esclarecerse si alguna enfermedad concomitante e inmunosupresora pudo agravar la infección.

Otro de los hallazgos que debe destacarse es la presencia de quistes tisulares en cerebro, que confirma la capacidad de *Besnoitia* spp. para formar quistes tisulares en el sistema nervioso central. De hecho, Dubey et al. (2004) ya describió la presencia de quistes tisulares de *B. tarandi* en cerebro de renos de 4 meses de edad. En cuanto a *B. besnoiti*, aunque Basson et al. (2013) detectaron ADN en el cerebro de una vaca crónicamente infectada, la presencia de quistes tisulares no había sido descrita hasta el momento. En relación a esta localización, resultó llamativo el escaso número de quistes tisulares y el pequeño tamaño de los mismos ($20-70 \mu\text{m}$), en comparación con aquellos encontrados en la dermis, la lámina propia y el estroma corneal ($100-200 \mu\text{m}$). Una posible explicación a este hecho podría ser que la respuesta inmunitaria hubiese limitado el crecimiento del quiste. Esta teoría se apoya en la intensa respuesta inflamatoria encontrada alrededor de los

quistes tisulares ubicados en la corteza cerebral. Ayround et al. (1995) encontró pequeños granulomas en cerebro en un reno infectado con *Besnoitia* spp., si bien no fue capaz de demostrar la presencia del parásito en dicha localización.

A la vista de los resultados obtenidos, la detección de la enfermedad en rumiantes silvestres que conviven en estrecho contacto con ganado bovino infectado parecen ser casos aislados y el origen de la infección por *Besnoitia* spp. así como su transmisión en el ciervo y en el corzo aún se desconoce. No obstante, la participación de un hospedador definitivo en un posible ciclo biológico silvático, así como la transmisión mecánica por medio de picaduras de artrópodos hematófagos deberían considerarse.

Finalmente, se llevó a cabo un estudio en pequeños rumiantes domésticos (sub-objetivo 2.5) siguiendo un diseño experimental similar al realizado en el sub-objetivo 2.3. Para ello, se seleccionaron dos zonas geográficas donde la besnoitiosis bovina es endémica (los Pirineos y Cantalojas, Guadalajara) y en las que el ganado bovino de carne comparte el mismo hábitat con las ovejas y las cabras. Concretamente, en Cantalojas el ganado bovino y el ovino comparten los mismos pastos, mientras que en los Pirineos se desconoce la distancia existente entre los rebaños. El protocolo diagnóstico fue el mismo que el descrito para rumiantes silvestres, y además, en el caso de las ovejas de Cantalojas, se realizó una inspección clínica exhaustiva similar a la realizada en el ganado bovino en el sub-objetivo 1.2. En este estudio no se detectaron signos clínicos compatibles con la enfermedad ni se detectaron anticuerpos específicos frente a *Besnoitia* spp. ni en cabras ni en ovejas. Este trabajo, aun presentando varias limitaciones en su diseño experimental como es la falta de algunos datos y el escaso número de muestras ($n=829$) y zonas ($n=2$) estudiadas, es el primero que se realiza en ovejas y cabras de Europa y constituye una primera aproximación para futuros estudios epidemiológicos.

Si bien los resultados obtenidos son preliminares, éstos sugieren una escasa participación de los pequeños rumiantes domésticos en la epidemiología de la besnoitiosis bovina en España, aunque la infección no debe descartarse en ninguna de las dos especies estudiadas. No obstante, a la vista de los resultados, al menos en Cantalojas, parece poco probable el papel de las ovejas como hospedadores intermediarios o reservorios de la infección por *B. besnoiti*, ya que, aun conviviendo con ganado bovino infectado desde el año 2003, no se han detectado nunca signos compatibles con la enfermedad. Una posible resistencia natural del ganado ovino a la infección por *Besnoitia* spp. podría explicar éstos resultados. Además el hecho de no se hayan descrito casos de infecciones naturales en ovejas y la imposibilidad de reproducir experimentalmente la fase crónica de la enfermedad (Pols, 1960) refuerza ésta hipótesis. Otra posible explicación podría ser una escasa transmisión del parásito por medio de artrópodos hematófagos. En relación a los tábanos, éstos tienen cierta preferencia por animales grandes y de capas oscuras (Krcmar et al., 2006; 2014) por lo que las picaduras a ovejas son menos probables (Baldacchino et al., 2014).

Por el contrario, en el caso de las cabras, los resultados no permiten descartar la infección en esta especie. Al igual que ocurre en las ovejas, la picadura de los tábanos en las cabras sería menos frecuente (Krcmar et al., 2006). Además, en el caso de los Pirineos, la distancia entre las granjas jugaría un papel crucial en la transmisión, ya que se ha demostrado que los tábanos se mueven en un radio menor de 50 metros (Barros y Foil., 2007). Por otra parte, al contrario que en las ovejas, en el caso de las cabras sí se han descrito tanto infecciones naturales como experimentales (Pols, 1960; Oryan et al., 2014). Sin embargo, la transmisión natural y artificial de *Besnoitia* spp. entre el ganado bovino y las cabras ha sido estudiada sin obtenerse resultados concluyentes (Pols, 1960; Bwangamoi et al., 1989; Njenga et al., 1993).

Finalmente, otro posible modo de transmisión tanto para ovejas como para cabras sería la ingestión de ooquistes, aunque se desconoce el hospedador definitivo de las especies de *Besnoitia* que afectan a ungulados y si éste está presente en España (Olias et al., 2011; Millán et al., 2012).

Por todo lo mencionado anteriormente, sería deseable llevar a cabo otros trabajos similares en regiones de España donde la enfermedad está presente en forma de brotes, como por ejemplo en sistemas de dehesa en Extremadura y Andalucía donde el ganado bovino, ovino, caprino y porcino se mantiene junto bajo un sistema de explotación extensivo. De igual forma, sería interesante realizar estudios similares en el ganado ovino y caprino en otros países del sur de Europa, donde la besnoitiosis bovina ya ha sido declarada (EFSA, 2010) para conocer el papel que juegan éstas especies en la epidemiología de la enfermedad, más aún cuando en estos países se concentran los mayores censos de ganado ovino y caprino (p. ej. Francia e Italia) (www.magrama.es).

En resumen, los pequeños rumiantes domésticos no intervendrían en el ciclo biológico de *B. besnoiti*, aunque se trata de un estudio preliminar y cuyos resultados deberían corroborarse con un mayor número de rebaños y animales. De hecho, en el caso de los rumiantes silvestres, fue necesario analizar un elevado número de muestras para confirmar la infección tanto en el ciervo como en el corzo. Si bien a la vista de los bajos valores de prevalencia y la dificultad para encontrar casos clínicos en la naturaleza, estas especies apenas participarían en la transmisión de la enfermedad al ganado bovino, por lo que la interconexión entre el ciclo biológico doméstico y silvático sería escasa. El análisis de microsatélites ha demostrado ser útil en estudios epidemiológicos para investigar qué especie de *Besnoitia* circula entre las especies de rumiantes silvestres de una determinada zona, confirmándose que tanto el ciervo como el corzo podrían actuar como hospedadores intermediarios de *B. besnoiti*. Sin embargo, son necesarios nuevos marcadores filogenéticos con el fin de estudiar más en profundidad la posible variabilidad genética existente en el género *Besnoitia*. Finalmente, queda por esclarecer la posibilidad de que tanto *B. tarandi* como *B. caprae* puedan infectar al ganado bovino.

CAPÍTULO VI: CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS



OBJETIVO 1. ESTUDIO DE LA SITUACIÓN ACTUAL DE LA BESNOITIOSIS BOVINA EN ESPAÑA EN ZONAS DONDE LA ENFERMEDAD ES ENDÉMICA.

- ❖ **Primera.** Los elevados valores de prevalencia de rebaño (87%), intra-rebaño (15,1%-95,7%) e individual (50%) obtenidos en zonas donde la besnoitiosis bovina es endémica demuestran la elevada diseminación de la infección o enfermedad en el ganado bovino de carne en extensivo. En ausencia de medidas de control adecuadas, estos valores se mantienen elevados a lo largo del tiempo puesto que las tasas anuales de incidencia serológica y clínica son también elevadas. La edad se confirma como un factor de riesgo, ya que tanto la seroprevalencia como la prevalencia clínica se incrementaron de forma significativa con la misma. Por el contrario, el sexo no es un factor de riesgo, ya que los valores de prevalencia individual fueron similares tanto en machos como en hembras.
- ❖ **Segunda.** A la hora de implementar un programa de control en una zona o granja donde la besnoitiosis es endémica el diagnóstico juega un papel clave pero presenta dos importantes limitaciones. En primer lugar, se ha comprobado que es necesaria una exhaustiva inspección clínica de los animales ya que los signos clínicos suelen ser leves y difícilmente detectables, limitándose en muchas ocasiones a la presencia de quistes tisulares únicamente en el vestíbulo vaginal. En segundo lugar, hay un elevado número de animales con quistes tisulares y niveles de anticuerpos específicos por debajo del punto de corte de la prueba ELISA, por lo que se recomienda el empleo del Western blot para reducir el número de resultados falsos negativos. Finalmente, una monitorización serológica del rebaño nos permitirá detectar animales crónicamente infectados que presenten fluctuaciones de los niveles de anticuerpos a lo largo del tiempo.
- ❖ **Tercera.** Las granjas ubicadas en zonas donde la enfermedad es endémica o con un historial previo de besnoitiosis presentan dos problemas que dificultan el control de la enfermedad. En primer lugar, se ha demostrado la presencia de un número elevado de animales portadores del parásito, cuyo movimiento a zonas libres de la enfermedad supone un elevado riesgo para la diseminación de la misma. En segundo lugar, existe riesgo de infertilidad o esterilidad en los machos introducidos y procedentes de zonas libres de la enfermedad, ya que la tasa anual de incidencia clínica y serológica es elevada. Por todo ello, se estima que las pérdidas económicas asociadas a la enfermedad podrían ser elevadas, siendo necesario realizar estudios de impacto económico.

OBJETIVO 2. ESTUDIO DE LA INFECCIÓN POR *BESNOITIA* SPP. EN OTRAS ESPECIES DE RUMIANTES QUE PUEDEN ACTUAR COMO RESERVORIOS U HOSPEDADORES INTERMEDIARIOS DE *B. BESNOITI*.

- ❖ **Primera.** Los taquizoítos de *B. besnoiti* pueden emplearse como antígeno en el diagnóstico de la infección por *Besnoitia* spp. en otras especies de rumiantes distintas al ganado bovino. Por primera vez, se ha descrito la intensa reacción cruzada existente entre *B. besnoiti* y *B. tarandi*, y cuando se emplearon taquizoítos de *B. besnoiti* y *B. tarandi* en las pruebas serológicas se detectaron anticuerpos específicos anti-*Besnoitia* en sueros de diferentes especies de rumiantes silvestres de Canadá, obteniéndose resultados similares. Se recomienda el empleo de la prueba ELISA en estudios serológicos a gran escala y el Western blot como técnica confirmatoria para evitar resultados falsos positivos asociados a reacciones cruzadas con otros protozoos apicomplejos.
- ❖ **Segunda.** La infección por *Besnoitia* spp. no es frecuente en las diferentes especies de rumiantes silvestres españoles y se limita, exclusivamente, a dos especies de Cervidae, el ciervo y el corzo, ubicados en zonas donde la enfermedad es endémica en el ganado bovino.
- ❖ **Tercera.** La presencia de *Besnoitia* spp. tanto en el ciervo como en el corzo confirma que ambas especies pueden actuar como hospedadores intermediarios del parásito. Los resultados del genotipado indican que la especie de *Besnoitia* que circula en los rumiantes silvestres de España es *B. besnoiti*. A pesar de que se demuestra una posible interconexión entre el ciclo biológico doméstico y silvático de *B. besnoiti*, se descarta al ciervo y al corzo como especies centinelas de la infección por *B. besnoiti*.
- ❖ **Cuarta.** Se ha descrito el primer caso de besnoitiosis sistémica en un corzo, en el que las lesiones macroscópicas y microscópicas, así como la distribución intra-orgánica del parásito fueron similares a las observadas durante la fase crónica de la besnoitiosis bovina. La amplia distribución intra-orgánica del parásito, una elevada carga parasitaria, junto con el pequeño tamaño de los quistes tisulares podrían indicar una rápida progresión de la enfermedad que pudo contribuir a la muerte del animal. Además, se describe, por primera vez la presencia de quistes tisulares de *B. besnoiti* en el sistema nervioso central, si bien la respuesta inmunitaria pudo limitar el desarrollo de los mismos en ésta localización dado su pequeño tamaño en comparación con los quistes tisulares presentes en otras localizaciones.

- ❖ **Quinta.** Los resultados del primer estudio serológico de la infección por *Besnoitia* spp. en ovejas y cabras en España sugieren una escasa participación de los pequeños rumiantes domésticos en el ciclo biológico de *B. besnoiti* al no detectarse anticuerpos específicos. No obstante, se necesitan nuevos estudios en Europa con un mayor número de animales y zonas muestreados que confirmen estos resultados.

OBJECTIVE 1. STUDY OF THE PRESENT SITUATION OF BOVINE BESNOITIOSIS IN SPANISH REGIONS WHERE THE DISEASE IS ENDEMIC

- ❖ **First.** High herd (87%), intra-herd (15.1%-95.7%) and individual (50%) prevalence rates obtained in regions where bovine besnoitiosis is endemic show that the disease is highly widespread in the beef cattle raised under extensive conditions. In the absence of a herd health scheme, these prevalence rates remain constant over time due to the high serological and clinical incidence rates. The age has been confirmed as a risk factor of infection since clinical prevalence as well as the seroprevalence increased significantly in older cattle. In contrast, the sex was not considered as a risk factor since individual prevalence rates were similar in both males and females.
- ❖ **Second.** An accurate diagnosis plays a key role for the success of any control program. However, it has been demonstrated that diagnosis of infection in a herd or area where bovine besnoitiosis is endemic faces two important limitations. First, it has been proven that an exhaustive clinical inspection in order to optimize the detection of mild and hardly detectable clinical signs (tissue cysts in sclera conjunctiva and *vestibulum vaginae*) is imperative. Second, there is a high percentage of animals with tissue cysts and antibody levels under the ELISA cut off. Thus, the use of the Western blot is needed in order to reduce false negative results. Finally, regular annual serological testing would help to detect antibody fluctuations in subclinically infected animals.
- ❖ **Third.** Herds located in regions where the disease is endemic or with a previous history of bovine besnoitiosis face two problems that could jeopardize the control of the disease. First, the presence of a high percentage of sub-clinical parasite carriers, which are traded to *Besnoitia*-free regions, constitutes a risk for the spread of the disease. Second, there is a risk of infertility or even sterility in recently acquired breeding bulls, which are usually traded. These naive animals introduced into an infected herd may contract the disease easily, supported by the high clinical and serological incidence rates. For this reason, the economic impact of the disease needs to be quantified, since economic losses of the disease in beef cattle industry is thought to be high.

OBJETIVE 2. STUDY OF *BESNOITIA* SPP. INFECTION IN OTHER RUMINANT SPECIES WHICH MAY ACT AS RESERVOIRS OR INTERMEDIATE HOSTS OF *B. BESNOITI*.

- ❖ **First.** *Besnoitia besnoiti* tachyzoites can be used as antigens for the diagnosis of *Besnoitia* spp. infection in ruminant species different from cattle. For the first time, strong cross-reaction between *B. besnoiti* and *B. tarandi* has been reported when tachyzoites of both species were employed in the serological techniques by analyzing different wild ruminant species from Canada. The use of the ELISA test is recommended in large-scale serosurveys whereas the Western blot is imperative as confirmatory diagnostic assay in order to avoid false-positive results associated to cross-reactions with closely related apicomplexan parasites.
- ❖ **Second.** *Besnoitia besnoiti* infection is unusual in the different Spanish wild ruminant species, which seem to be restricted to Cervidae species, roe deer and red deer, located in regions where bovine besnoitiosis is endemic.
- ❖ **Third.** The presence of *Besnoitia* spp. in red deer and roe deer confirm that both species can act as intermediate hosts of the parasite. Molecular genotyping results suggest that the *Besnoitia* species, which circulates among wild ruminants in Spain, is *B. besnoiti*. However, even though the inter-conexion between *B. besnoiti* domestic and sylvatic life cycles has been proven, roe deer and red deer do not pose a risk of transmitting the infection to cattle and are not good sentinels of bovine besnoitiosis.
- ❖ **Fourth.** For the first time a systemic besnoitiosis in a roe deer has been reported. Macroscopic and microscopic lesions as well as the intra-organic distribution of the parasite were similar to those observed in the chronic stage of bovine besnoitiosis. The wide parasite intra-organic distribution and high tissue cyst burden together with the small size of *Besnoitia* cysts (<200 µm) with minimal or absent inflammatory response may be indicative of the severity and a rapid progression of the disease. For the first time, the presence of tissue cysts in brain has been described, which confirms the capacity of *B. besnoiti* to form tissue cysts in the CNS. Considering the scarce tissue cyst development a feasible explanation might be that the immune response could have limited cyst growth (20-70 µm) supported by the inflammatory response found in brain cortex.

- ❖ **Fifth.** The results of the first serosurvey of *Besnoitia* spp. infection in Spanish sheep and goats suggest a negligible role of small domestic ruminants in the life cycle of *B. besnoiti* due to the absence of specific anti-*Besnoitia* spp. infection. However, further studies in Europe are needed which would sample a higher number of animals and regions.

CAPÍTULO VII: BIBLIOGRAFÍA



BIBLIOGRAFÍA

- **Abel, J.**, Schares, G., Orzeszko, K., Gasser, R.B., Ellis, J.T., **2006**. *Hammondia* isolated from dogs and foxes are genetically distinct. *Parasitology*. 132, 187-192.
- **Acevedo, P.**, Delibes-Mateos, M., Escudero, M.A., Vicente, J., Marco, J., Gortázar, C., **2005**. Environmental constraints in the colonization sequence of roe deer (*Capreolus capreolus* Linnaeus, 1758) across the Iberian Mountains, Spain. *J. Biogeogr.* 32, 1671-1680.
- **Agosti, M.**, Belloni, A., Morini, Vacirca, G., **1994**. Segnalazione di un focolaio di besnoitiosi in bovini da carne importati. *Praxis. Vet.* 15, 5-6.
- **Almería, S.**, Vidal, D., Ferrer, D., Pabon, M., Fernández-de-Mera, M.I., Ruiz-Fons, F., Alzaga, V., Marco, I., Calvete, C., Lavin, S., Gortázar, C., López-Gatius, F., Dubey, J.P., **2007**. Seroprevalence of *Neospora caninum* in non-carnivorous wildlife from Spain. *Vet. Parasitol.* 143, 21-28.
- **Álvarez-García, G.**, Pereira-Bueno, J., Gómez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M., **2002**. Pattern of recognition of *Neospora caninum* tachyzoite antigens by naturally infected pregnant cattle and aborted fetuses. *Vet. Parasitol.* 107, 15-27.
- **Álvarez-García, G.**, Frey, C.F., Mora, L.M., Schares, G., **2013**. A century of bovine besnoitiosis: an unknown disease re-emerging in Europe. *Trends. Parasitol.* 29, 407-415.
- **Álvarez-García, G.**, García-Lunar, P., Gutiérrez-Expósito, D., Shkap, V., Ortega-Mora, L.M., **2014a**. Dynamics of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle. *Parasitology*. 141, 1419-1435.
- **Álvarez-García, G.**, Fernández-García, A., Gutiérrez-Expósito, D., Quiteria, J.A., Aguado-Martínez, A., Ortega-Mora, L.M., **2014b**. Seroprevalence of *Besnoitia besnoiti* infection and associated risk factors in cattle from an endemic region in Europe. *Vet. J.* 200, 328-331.
- **Alzieu, J.P.**, **1991**. La besnoitiose bovine ou anasarque des bovins. *Bulletin. GTV.* 6, 157-161.
- **Alzieu, J.P.**, **2000**. La besnoitiose ou anasarque des bovins: une parasitose en extension á bien diagnostiquer. *Journées nationales GTV, Dijon.* 343-345.
- **Alzieu, J.P.**, **2007**. Re-emerging cattle besnoitiosis (*Besnoitia besnoiti*) in France: update on clinical and epidemiological aspects. In: *Proceedings of 21st International Conference WAAVP, Gante (Belgium).* pp 222.
- **Apollonio, M.**, Andersen, R., Putman, R., **2010**. In: *European Ungulates and their management in the 21st century.* Cambridge University Press. pp 618.
- **Ashmawy, K.I.**, Abu-Akkada, S.S., **2014**. Evidence for bovine besnoitiosis in Egypt-first serosurvey of *Besnoitia besnoiti* in cattle and water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Egypt. *Trop. Anim. Health Prod.* 46, 519-522.

- **Atkinson**, R., Harper, P.A., Ryce, C., Morrison, D.A., Ellis, J.T., **1999**. Comparison of the biological characteristics of two isolates of *Neospora caninum*. *Parasitology*. 118, 363-370.
- **Ayroud**, M., Leighton, F.A., Tessaro, S.V., **1995**. The morphology and pathology of *Besnoitia* spp. in reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *J. Wildl. Dis.* 31, 319-326.
- **Baldacchino**, F., Gardés, L., De Stordeur, E., Jay-Robert, P., Garros, C. **2014**. Blood-feeding patterns of the horse flies in the French Pyrenees. *Vet. Parasitol.* 199, 283-288.
- **Barros**, A.T.M., Foil, L.D., **2007**. The influence of distance on movement of tabanids (Diptera: Tabanidae) between horses. *Vet. Parasitol.* 144, 380-384.
- **Barta**, J.R., **2001**. Molecular approaches for inferring evolutionary relationships among protistan parasites. *Vet. Parasitol.* 101, 175-186.
- **Basso**, W., Schares, G., Gollnick, N.S., Rutten, M., Deplazes, P., **2011**. Exploring the life cycle of *Besnoitia besnoiti* - experimental infection of putative definitive and intermediate host species. *Vet. Parasitol.* 178, 223-234.
- **Basso**, W., Lesser, M., Grimm, F., Hilbe, M., Sydler, T., Trosch, L., Ochs, H., Braun, U., Deplazes, P., **2013**. Bovine besnoitiosis in Switzerland: Imported cases and local transmission. *Vet. Parasitol.* 198, 265-273.
- **Basson**, P.A., Van Niekerk, J., McCully, R.M., Bigalke, R.D., **1965**. Besnoitiosis in South African antelopes: a preliminary note on the occurrence of *Besnoitia* cysts in the cardiovascular system. *J. S. Afr. Vet. Med. Ass.* 36, 578.
- **Basson**, P.A., McCully, R.M., Bigalke, R.D., **1970**. Observations on the pathogenesis of bovine and antelope strains of *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) infection in cattle and rabbits. Onderstepoort. *J. Vet. Res.* 37, 105-126.
- **Beck**, R., Štoković, I., Pleadin, J., Beck, A. **2013**. Bovine besnoitiosis in Croatia. In: *Proceedings of II International Meeting on Apicomplexan Parasites in Farm Animals*, Kusadasi, Turkey. p 64.
- **Bennett**, S., **1927**. A peculiar equine sarcosporidium in the Anglo-Egyptian Sudan. *Vet. J.* 83, 297-304.
- **Besnoit**, C., **Robin**, V., **1912**. Sarcosporidiose cutanée chez une vache. *Rev. Vet.* 37, 649-663.
- **Bigalke**, R., **Naude**, T., **1962**. The diagnostic value of cysts in the scleral conjunctiva in bovine besnoitiosis. *J. S. Afr. Vet. Med. Assoc.* 33, 21-27.
- **Bigalke**, R.D., **1967a**. The artificial transmission of *Besnoitia besnoiti* (Marotel, 1912) from chronically infected to susceptible cattle and rabbits. Onderstepoort. *J. Vet. Res.* 34, 303-316.

- **Bigalke**, R.D., van Niekerk, J.W., Basson, P.A., McCully, R.M., **1967b**. Studies on the relationship between *Besnoitia* of blue wildebeest and impala, and *Besnoitia besnoiti* of cattle. Onderstepoort. J. Vet. Res. 34, 7-28.
- **Bigalke**, R.D., **1968**. New concepts on the epidemiological features of bovine besnoitiosis as determined by laboratory and field investigations. Onderstepoort. J. Vet. Res. 35, 3-137.
- **Bigalke**, R.D., Schoeman, J.H., McCully, R.M., **1974**. Immunization against bovine besnoitiosis with a live vaccine prepared from a blue wildebeest strain of *Besnoitia besnoiti* grown in cell cultures. Studies on rabbits. Onderstepoort. J. Vet. Res. 41, 1-5.
- **Bigalke**, R.D., **1981**. Besnoitiosis and globidiosis. In: Diseases of cattle in the tropics. Ristic, M., McIntyre, I (Eds). The Netherlands. pp 429-442.
- **Bigalke**, R.D., Prozesky, L., **2004**. Besnoitiosis. In: Infectious diseases of livestock. Coetzer, JAW and Tustin R.C (Ed.), Vol 1. Oxford University Press, Cape Town, South Africa, pp. 331-359.
- **Bwangamoi**, O., **1967**. A preliminary report on the finding of *Besnoitia besnoiti* in goat skin affected with dimple in Kenya. Bull. Epizoot. Dis. Afr. 15, 263-271.
- **Bwangamoi**, O., **1968**. Besnoitiosis and other skin diseases of cattle (*Bos indicus*) in Uganda. Am. J. Vet. Res. 29, 737-743.
- **Bwangamoi**, O., Carles, A.B., Wandera, J.G., **1989**. An epidemic of besnoitiosis in goats in Kenya. Vet. Rec. 125, 461.
- **Cadéac**, **1884**. Identité de l'éléphantiasis et de l'anasarque du boeuf. Description de cette maladie. Revue vétérinaire , 521.
- **Castillo**, J.A., Marcén, J.M., Ortega-Mora, L.M., Alvarez-García, G., **2009**. La besnoitiosis bovina, presentada como una enfermedad emergente europea. Albeitar. 127, 24-25.
- **Chatikobo**, P., Choga, T., Ncube, C., Mutambara, J., **2013**. Participatory diagnosis and prioritization of constraints to cattle production in some smallholder farming areas of Zimbabwe. Prev. Vet. Med. 109, 327-333.
- **Cheema**, A.H., **Toofanian**, F., **1979**. Besnoitiosis in wild and domestic goats in Iran. Cornell Vet. 69, 159-168.
- **Choquette**, L.P.E., Beoughton, E., Miller, F.L., Gibbs, H.C., Cousineau, J.G., **1967**. Besnoitiosis in barren-ground caribou in Northern Canada. Can. Vet. J. 8, 282-287.
- **Cortés**, H.C., Vidal, R., Reis, Y., **2004**. Bovine besnoitiosis, one approach for a better understanding of its importance in Portugal. In: Proceedings of 23rd World Buiatrics Congress, Quebec (Canadá), pp 35-36.
- **Cortés**, H.C., Reis, Y., Waap, H., Marcelino, E., Vaz, Y., Nunes, T., Fanzendeiro, I., Caeiro, V., Leitaó, A., **2006a**. Longitudinal study of *Besnoitia besnoiti* infection prevalence rates in

- a beef cattle herd in Alentejo, Portugal. In: Proceedings of the COST 854 Final Conference, Liege, Belgium, p 20.
- **Cortés, H.C., Reis, Y., Waap, H., Vidal, R., Soares, H., Marques, I., Pereira da Fonseca, I., Fazendeiro, I., Ferreira, M.L., Caeiro, V., Shkap, V., Hemphill, A., Leitao, A., 2006b.** Isolation of *Besnoitia besnoiti* from infected cattle in Portugal. *Vet. Parasitol.* 141, 226-233.
 - **Cortés, H.C., Nunes, S., Reis, Y., Staubli, D., Vidal, R., Sager, H., Leitao, A., Gottstein, B., 2006c.** Immunodiagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection by ELISA and Western blot. *Vet. Parasitol.* 141, 216-225.
 - **Cortés, H.C., Chagas e Silva, J., Baptista, M.C., Pereira, R.M., Leitao, A., Horta, A.E.M., Vasques, M.I., Barbas, J.P., Marques, C.C. 2006d.** *Besnoitia besnoiti* impact on fertility of cattle exploited in Mediterranean pastures (Alentejo). In: Animal products from the Mediterranean area; EAAP publication. 119, 323-329.
 - **Cortés, H.C., Mueller, N., Esposito, M., Leitao, A., Naguleswaran, A., Hemphill, A., 2007a.** *In vitro* efficacy of nitro- and bromo-thiazolyl-salicylamide compounds (thiazolides) against *Besnoitia besnoiti* infection in Vero cells. *Parasitology.* 134, 975-985.
 - **Cortés, H.C., Reis, Y., Gottstein, B., Hemphill, A., Leitao, A., Muller, N., 2007b.** Application of conventional and real-time fluorescent ITS1 rDNA PCR for detection of *Besnoitia besnoiti* infections in bovine skin biopsies. *Vet. Parasitol.* 146, 352-356.
 - **Cortés, H.C., Muller, N., Boykin, D., Stephens, C.E., Hemphill, A., 2011.** *In vitro* effects of arylimidamides against *Besnoitia besnoiti* infection in Vero cells. *Parasitol.* 138, 583-592.
 - **Cortés, H., Leitao, A., Gottstein, B., Hemphill, A., 2014.** A review on bovine besnoitiosis: a disease with economic impact in herd health management, caused by *Besnoitia besnoiti* (Franco and Borges). *Parasitology.* 141, 1406-1417.
 - **Cuillé, J., Chelle, P., Berlureau, F, 1936.** Transmission expérimentale de la maladie dénommée "Sarcosporidiose cutanée" du boeuf (Besnoit et Robin) et déterminée par *Globidium besnoiti*. *Bull. Acad. Méd.* 115, 161-163.
 - **Cuillé, J y Chelle, P., 1937.** Nouvelles recherches sur la transmission expérimentale de la maladie appelée "anasarque des bovidés" (globidiose cutanée du boeuf). *Bull. Acad. Med.* 118, 217-219.
 - **D'Avino, N., Maresca, C., Costarelli, S., Filippini, G., Gentile, A., Felici, A., Dettori, A., Sebastianelli, M., Broccatelli, S., Cordovani, E., Righi, C., 2014.** Spreading survey of *Besnoitia besnoiti* in Italian cattle population. In: Proceedings of XXVIII Congress of the Italian Society of Parasitology. Rome, Italy. p 189.
 - **Delaffosse, A., 2011.** Enquete serologique sur l'introduction de la besnoitiose bovine dans l'Orne. *Le Point Vétérinaire.* 317, 52-56.

- **Día, P., López, C., Panadero, R., Diez-Baños, P., Morrondo, P., Moreno-Gonzalo, J., Ortega-Mora, L., Álvarez-García, G., 2015.** First detection of anti-*Besnoitia besnoiti* specific antibodies in a cow from Galicia. In: Proceedings of the XX International ANEMBE Congress, Burgos, Spain.
- **Diesing, L., Heydorn, A.O., Matuschka, F.R., Bauer, C., Pipano, E., de Waal, D.T., Potgieter, F.T., 1988.** *Besnoitia besnoiti*: studies on the definitive host and experimental infections in cattle. Parasitol. Res. 75, 114-117.
- **Diezma-Díaz, C., Benavides-Silván, J., Jiménez-Meléndez, A., Gutiérrez-Expósito, D., García-Lunar, P., Ortega-Mora, L.M., Alvarez-García, G.,** First case of bovine chronic besnoitiosis in a calf. Manuscrito en preparación.
- **Dubey, J.P., 1977.** Taxonomy of *Sarcocystis* and other Coccidia of cats and dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 170, 778-782.
- **Dubey, J.P., Hattel, A.L., Lindsay, D.S., Topper, M.J., 1988.** Neonatal *Neospora caninum* infection in dogs - Isolation of the causative agent and experimental transmission. J. Am. Vet. Med. Assoc. 193, 1259-1263.
- **Dubey, J.P., Speer, C., Fayer, R., 1989.** Sarcocystosis of animals and man. CRC Press, Boca Ratón (Ed). pp 215
- **Dubey, J.P., Lindsay, D.S., Rosenthal, B.M., Sreekumar, C., Hill, D.E., Shen, S.K., Kwok, O.C., Rickard, L.G., Black, S.S., Rashmir-Raven, A., 2002.** Establishment of *Besnoitia darlingi* from opossums (*Didelphis virginiana*) in experimental intermediate and definitive hosts, propagation in cell culture, and description of ultrastructural and genetic characteristics. Int. J. Parasitol. 32, 1053-1064.
- **Dubey, J.P., Shkap, V., Pipano, E., Fish, L., Fritz, D.L., 2003a.** Ultrastructure of *Besnoitia besnoiti* tissue cysts and bradyzoites. J. Eukaryot. Microbiol. 50, 240-244.
- **Dubey, J.P., Lindsay, D.S., 2003b.** Development and ultrastructure of *Besnoitia oryctofelisi* tachyzoites, tissue cysts, bradyzoites, schizonts and merozoites. Int. J. Parasitol. 33, 807-819.
- **Dubey, J.P., Sreekumar, C., Rosenthal, B.M., Lindsay, D.S., Grisard, E.C., Vitor, R.W.A., 2003c.** Biological and molecular characterization of *Besnoitia akodoni* n.sp (Protozoa: Apicomplexa) from the rodent *Akodon montensis* in Brazil. Parassitologia (Rome). 45, 61-70.
- **Dubey, J.P., Sreekumar, C., Lindsay, D.S., Hill, D., Rosenthal, B.M., Venturini, L., Venturini, M.C., Greiner, E.C., 2003d.** *Besnoitia oryctofelisi* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa) from domestic rabbits. Parasitol. 126, 521-539.

- **Dubey, J.P., Sreekumar, C., Rosenthal, B.M., Vianna, M.C., Nylund, M., Nikander, S., Oksanen, A., 2004.** Redescription of *Besnoitia tarandi* (Protozoa: Apicomplexa) from the reindeer (*Rangifer tarandus*). *Int. J. Parasitol.* 34, 1273-1287.
- **Dubey, J.P., Sreekumar, C., Donovan, T., Rozmanec, M., Rosenthal, B.M., Vianna, M.C., Davis, W.P., Belden, J.S., 2005.** Redescription of *Besnoitia bennetti* (Protozoa: Apicomplexa) from the donkey (*Equus asinus*). *Int. J. Parasitol.* 35, 659-672.
- **Dubey, J.P., Jones, J.L., 2008.** *Toxoplasma gondii* infection in humans and animals in the United States. *Int. J. Parasitol.* 38, 1257-1278.
- **Dubey, J.P., Yabsley, M.J., 2010.** *Besnoitia neotomofelis* n. sp. (Protozoa: Apicomplexa) from the southern plains woodrat (*Neotoma micropus*). *Parasitology*. 137, 1731-1747.
- **Dubey, J.P., Schares, G., 2011.** Neosporosis in animals-The last five years. *Vet. Parasitol.* 180, 90-108.
- **Dubey, J.P., van Wilpe, E., Blignaut, D.J., Schares, G., Williams, J.H., 2013.** Development of early tissue cysts and associated pathology of *Besnoitia besnoiti* in a naturally infected bull (*Bos taurus*) from South Africa. *J. Parasitol.* 99, 459-466.
- **Ducrocq, J., Beauchamp, G., Kutz, S., Simard, M., Elkin, B., Croft, B., Taillon, J., Cote, S.D., Brodeur, V., Campbell, M., Cooley, D., Cuyler, C., Lair, S., 2012.** Comparison of gross visual and microscopic assessment of four anatomic sites to monitor *Besnoitia tarandi* in barren-ground caribou (*Rangifer tarandus*). *J. Wildl. Dis.* 48, 732-738.
- **Ducrocq, J., Beauchamp, G., Kutz, S., Simard, M., Taillon, J., Cote, S.D., Brodeur, V., Lair, S., 2013.** Variables associated with *Besnoitia tarandi* prevalence and cyst density in barren-ground caribou (*Rangifer tarandus*) populations. *J. Wildl. Dis.* 49, 29-38.
- **Ellis, J.T., Holmdahl, O.J., Ryce, C., Njenga, J.M., Harper, P.A., Morrison, D.A., 2000.** Molecular phylogeny of *Besnoitia* and the genetic relationships among *Besnoitia* of cattle, wildebeest and goats. *Protist*. 151, 329-336.
- **EFSA, European Food Safety Authority, 2010.** Scientific statement on bovine besnoitiosis, Available from <<http://www.efsa.europa.eu>>.
- **Esteban-Gil, A., Grisez, C., Prevot, F., Florentin, S., Decaudin, A., Picard-Hagen, N., Berthelot, X., Ronsin, P., Alzieu, J.P., Marois, M., Corboz, N., Peglion, M., Vilardell, C., Lienard, E., Bouhsira, E., Castillo, J.A., Franc, M., Jacquet, P., 2014.** No detection of *Besnoitia besnoiti* DNA in the semen of chronically infected bulls. *Parasitol. Res.* 113, 2355-2362.
- **Fernández de Luco, D., Gortázar, C., Castillo J.A., 2000.** Besnoitiosis (*Besnoitia* sp.) in a roe deer (*Capreolus capreolus*). In: Proceedings of the 4th meeting of the European Wildlife Disease Association. Zaragoza, Spain. pp. 55.

- **Fernández-García, A., Álvarez-García, G., Risco-Castillo, V., Aguado-Martínez, A., Marugán-Hernández, V., Ortega-Mora, L.M., 2009a.** Pattern of recognition of *Besnoitia besnoiti* tachyzoite and bradyzoite antigens by naturally infected cattle. *Vet. Parasitol.* 164, 104-110.
- **Fernández-García, A., Risco-Castillo, V., Pedraza-Díaz, S., Aguado-Martínez, A., Álvarez-García, G., Gómez-Bautista, M., Collantes-Fernández, E., Ortega-Mora, L.M., 2009b.** First isolation of *Besnoitia besnoiti* from a chronically infected cow in Spain. *J. Parasitol.* 95, 474-476.
- **Fernández-García, A., Álvarez-García, G., Risco-Castillo, V., Aguado-Martínez, A., Marcén, J.M., Rojo-Montejo, S., Castillo, J.A., Ortega-Mora, L.M., 2010.** Development and use of an indirect ELISA in an outbreak of bovine besnoitiosis in Spain. *Vet. Rec.* 166, 818-822.
- **Ferreira, M., Petisca, J., Díaz, O., Pires-Ferreira, M., Nunes-Petisca, J., 1983.** Testicular lesions in bulls in Mozambique with and without clinical signs of besnoitiosis. *Repositorio de trabalhos do instituto nacional de veterinaria* 2, 79-108.
- **Ferrié, J., 1984.** La besnoitiose bovine. *Revue bibliographique. Observations personnelles.* Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de Toulouse, Francia.
- **Finazzi, M., Grieco, V., Camisasca, S., Zanoni, M., 1995.** The bovine besnoitiosis. *Summa (Italy).*
- **Fouquet, C.M., 2009.** La besnoitiose bovine: suivi épidémiologique de l'épizootie de la région PACA. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria de Lyon, Francia.
- **Franc, M., Gourreau, J., Ferrie, J., 1987.** La besnoitiose bovine. *Le Point Veterinaire* 19, 445-455.
- **Franc, M., Cardiegues, M., 1999.** La besnoitiose bovine: attitude diagnostique et therapeutique. *Bulletin des GTV. Bovins, Parasitologie.* 119-124.
- **Franco e Borges, 1915.** Nota sobre a sarcosporidiose bovina. *Revista de Medicina Veterinária.* pp 255-299.
- **Frank, M., Klinger, I., Pipano, E., 1970.** The presence of antibody of *Besnoitia besnoiti* in beef and dairy cattle. *J. Protozool.* 17, 31. Suppl. 1970.
- **Frank, M., Pipano, E., Rosenberg, A., 1977.** Prevalence of antibodies against *Besnoitia besnoiti* in beef and dairy cattle in Israel. *Refuah. Veterinarith.* 34, 83-86.
- **Freudiger, I., 2008.** La besnoitiose bovine: étude épidémiologique de l'épizootie des Alpes de-Haute-Provence et des Hautes-Alpes. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de Lyon, Francia.
- **Frey, C.F., Gutiérrez-Expósito, D., Ortega-Mora, L.M., Benavides, J., Marcén, J.M., Castillo, J.A., Casasús, I., Sanz, A., García-Lunar, P., Estéban-Gil, A., Álvarez-García, G., 2013.**

- Chronic bovine besnoitiosis: intra-organ parasite distribution, parasite loads and parasite-associated lesions in subclinical cases. *Vet. Parasitol.* 197, 95-103.
- **Frey, C.F.,** Regidor-Cerrillo, J., Marreros, N., García-Lunar, P., Gutiérrez-Expósito, D., Schares, G., Dubey, J.P., Gentile, A., Jacquet, P., Shkap, V., Cortés, H., Ortega-Mora, L.M., Álvarez-García, G., **submitted.** *Besnoitia besnoiti* lytic cycle *in vitro* and differences in invasion and intracellular proliferation among isolates. *Parasit. Vectors.*
 - **García-Lunar, P.,** Ortega-Mora, L.M., Rojo-Montejo, S., Castillo, J.A., Álvarez-García, G., **2010.** Actuación del veterinario antes un brote de besnoitiosis bovina. En: Proceedings del XV Congreso Internacional Anembe de Medicina Bovina. pp. 229-231.
 - **García-Lunar, P.,** Ortega-Mora, L.M., Gutiérrez-Expósito, D., Castillo, J.A., Álvarez-García, G., **2011.** Besnoitiosis bovina: una enfermedad emergente en Europa. *Tierras Ganadería.* 176, 68-73.
 - **García-Lunar, P.,** Ortega-Mora, L.M., Schares, G., Gollnick, N.S., Jacquet, P., Grisez, C., Prevot, F., Frey, C.F., Gottstein, B., Álvarez-García, G., **2013a.** An inter-laboratory comparative study of serological tools employed in the diagnosis of *Besnoitia besnoiti* Infection in bovines. *Transbound. Emerg. Dis.* 60, 59-68.
 - **García-Lunar, P.,** Regidor-Cerrillo, J., Gutiérrez-Expósito, D., Ortega-Mora, L., Álvarez-García, G., **2013b.** First 2-DE approach towards characterising the proteome and immunome of *Besnoitia besnoiti* in the tachyzoite stage. *Vet. Parasitol.* 195, 24-34.
 - **García-Lunar, P.,** Regidor-Cerrillo, J., Ortega-Mora, L.M., Gutiérrez-Expósito, D., Álvarez-García, G., **2014.** Proteomics reveals differences in protein abundance and highly similar antigenic profiles between *Besnoitia besnoiti* and *Besnoitia tarandi*. *Vet. Parasitol.* 205, 434-443.
 - **García-Lunar, P.,** Moré, G., Campero, L., Ortega-Mora, L.M., Álvarez-García, G., **2015.** Anti-*Neospora caninum* and anti-*Sarcocystis* spp. specific antibodies cross-react with *Besnoitia besnoiti* and influence the serological diagnosis of bovine besnoitiosis. *Vet. Parasitol.* 214, 49-54.
 - **Gaspar, P.,** Mesías, F.J., Escribano, M., Rodríguez de Ledesma, A., Pulido, F., **2007.** Economic and management characterization of dehesa farms: implications for their sustainability. *Agroforestry. Systems.* 71, 151-162.
 - **Gauss, C.B.L.,** Dubey, J.P., Vidal, D., Cabezón, O., Ruiz-Fons, F., Vicente, J., Marco, I., Lavín, S., Gortázar, C., Almería, S., **2006.** Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in red deer (*Cervus elaphus*) and other wild ruminants from Spain. *Vet. Parasitol.* 136, 193-200.
 - **Gazzonis, A.L.,** García, G., Zanzani, S.A., Garippa, G., Rossi, L., Maggiora, M., Dini, V., Invernizzi, A., Luini, M., Tranquillo, V.M., Mora, L., Manfredi, M., **2014.** *Besnoitia besnoiti*

- among cattle in insular and northwestern Italy: endemic infection or isolated outbreaks? *Parasit. Vectors.* 7, 1-8.
- **Genest, M., 2008.** La besnoitiose bovine a *Besnoitia besnoiti*: Enquete serologique et ecologique dans un foyer d'urgence du Maine et Loire. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria de Nantes, Francia.
 - **Gentile, A., Militerno, G., Schares, G., Nanni, A., Testoni, S., Bassi, P., Gollnick, N.S., 2012.** Evidence for bovine besnoitiosis being endemic in Italy-First in vitro isolation of *Besnoitia besnoiti* from cattle born in Italy. *Vet. Parasitol.* 184, 108-115.
 - **Glover, G.J., Swendrowski, M., Cawthorn, R.J., 1990.** An epizootic of besnoitiosis in captive caribou (*Rangifer tarandus caribou*), reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) and mule deer (*Odocoileus hemionus hemionus*). *J. Wildl. Dis.* 26, 186-195.
 - **Goldman, M., Pipano, E., 1983.** Serological studies on bovine besnoitiosis in Israel. *Trop. Anim. Health Prod.* 15, 32-38.
 - **Gollnick, N.S., Gentile, A., Schares, G., 2010.** Diagnosis of bovine besnoitiosis in a bull born in Italy. *Vet. Rec.* 166, 599.
 - **Gollnick, N.S., Scharr, J.C., Schares, G., Langenmayer, M.C., 2015.** Natural *Besnoitia besnoiti* infections in cattle: chronology of disease progression. *BMC. Vet. Res.* 11, 35.
 - **Gondim, L.F.P., 2006.** *Neospora caninum* in wildlife. *Trends Parasitol.* 22, 247-252.
 - **González-Warleta, M., Castro-Hermida, J.A., Regidor-Cerrillo, J., Benavides, J., Álvarez-García, G., 2014.** *Neospora caninum* infection as a cause of reproductive failure in a sheep flock. *Vet. Res.* 45, 88.
 - **Gorlin, R., Barron, C., Chaudhry, A., Clark, J., 1959.** The oral and pharyngeal pathology of domestic animals. A study of 487 cases. *Am. J. Vet. Res.* 20, 1032-1061.
 - **Gortázar, C., Herrero, J., Villafuerte, R., Marco, J., 2000.** Historical examination of the status of large mammals in Aragon, Spain. *Mammalia* 64, 411-422.
 - **Gortázar, C., Vicente, J., Boadella, M., Ballesteros, C., Galindo, R.C., Garrido, J., Aranaz, A., de la Fuente, J., 2011.** Progress in the control of bovine tuberculosis in Spanish wildlife. *Vet. Microbiol.* 151, 170-178.
 - **Greiner, M., Sohr, D., Göbel, P., 1995.** A modified ROC analysis for the selection of cut-off values and the definition of intermediate results of serodiagnostic tests. *J. Immunol. Methods.* 185, 123-132.
 - **Greiner, M., Gardner, I.A., 2000.** Epidemiological issues in the validation of veterinary diagnostic tests. *Prev. Vet. Med.* 45, 3-22.
 - **Grigg, M.E., Suzuki, Y., 2003.** Sexual recombination and clonal evolution of virulence in *Toxoplasma*. *Microb. Infect.* 5, 685-690.

- **Gutiérrez-Expósito, D., Ortega-Mora, L.M., Gajadhar, A.A., García-Lunar, P., Dubey, J.P., Álvarez-García, G., 2012.** Serological evidence of *Besnoitia* spp. infection in Canadian wild ruminants and strong cross-reaction between *Besnoitia besnoiti* and *Besnoitia tarandi*. *Vet. Parasitol.* 190, 19-28.
- **Gutiérrez-Expósito, D., Ortega-Mora, L.M., Marco, I., Boadella, M., Gortázar, C., San Miguel-Ayanz, J.M., García-Lunar, P., Lavín, S., Álvarez-García, G., 2013.** First serosurvey of *Besnoitia* spp. infection in wild European ruminants in Spain. *Vet. Parasitol.* 197, 557-564.
- **Gutiérrez-Expósito, D., Esteban-Gil, A., Ortega-Mora, L.M., García-Lunar, P., Castillo, J.A., Marcén, J.M., Álvarez-García, G., 2014.** Prevalence of *Besnoitia besnoiti* infection in beef cattle from the Spanish Pyrenees. *Vet. J.* 200, 468-470.
- **Gutiérrez-Expósito, D., Arnal, M.C, Martínez-Durán, D., Regidor-Cerrillo, J., Revilla, M., Fernández de Luco, D., Jiménez-Meléndez, A., Calero-Bernal, R., Habela-Martínez-Estéllez, M.A., García-Bocanegra, I., Arenas-Montes, A., Ortega-Mora, L.M., Álvarez-García, G., Submitted.** The role of wildruminants as reservoirs of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle. *Vet. Parasitol.*
- **Hadwen, S., 1922.** Cyst-forming protozoa in reindeer and caribou, and a sarcosporidian parasite of the seal (*Phoca richardi*). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 61, 374-382.
- **Henry, A., Masson, G., 1922.** Globidiose cutanée du cheval. *Traite de protozoologie médicale et vétérinaire.* 386-387.
- **Herin, V.V., 1952.** Note sur le existence de la Globidiose bovine an Ruanda-Urundi. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* 32, 155-160.
- **Heydorn, A.O., Senaud, J., Mehlhorn, H., Heinonen, R., 1984.** *Besnoitia* spp. from goats in Kenya. *Z. Parasitenkd.* 70, 709-713.
- **Hilali, M., Rehbindler, C., Nikkilä, T., 1990.** Ultrastructure of *Besnoitia* cysts from reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*). *Rangifer.* 10, 335-342.
- **Hofmeyr, C.F.B., 1945.** Globidiosis in cattle. *J. S. Afr. Vet. Med. Ass.* 16, 102-109.
- **Honigberg, B.M., Balamuth, W., Bovee, E.C., Corliss, J.O., Gojdics, M., Hall, R.P., Kudo, R.R., Levine, N.D., Loeblich, A.R., Jr, Weiser, J., Wenrich, D.H., 1964.** A revised classification of the Phylum Protozoa. *J. Protozool.* 11, 7-20.
- **Hornok, S., Fedak, A., Baska, F., Hofmann-Lehmann, R., Basso, W., 2014.** Bovine besnoitiosis emerging in Central-Eastern Europe, Hungary. *Parasit. Vectors.* 7, 20, 1-5.
- **Hornok, S., Estok, P., Kovats, D., Flaisz, B., Takacs, N., Szoke, K., Krawczyk, A., Kontschan, J., Gyuranecz, M., Fedak, A., Farkas, R., Haarsma, A.J., Sprong, H., 2015a.** Screening of bat faeces for arthropod-borne apicomplexan protozoa: *Babesia canis* and *Besnoitia besnoiti*-like sequences from Chiroptera. *Parasit. Vectors.* 8, 441, 1-6.

- **Hornok, S., Fedak, A., Baska, F., Basso, W., Dencso, L., Toth, G., Szeredi, L., Abonyi, T., Denes, B., 2015b.** Vector-borne transmission of *Besnoitia besnoiti* by blood-sucking and secretophagous flies: epidemiological and clinicopathological implications. *Parasit. Vectors* 8, 450, 1-6.
- **Huang, X., Miller, W., 1991.** A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Adv. Appl. Math.* 12, 337-357.
- **Hutchison, W.M., 1965.** Experimental transmission of *Toxoplasma gondii*. *Nature.* 206, 961-962.
- **Igbokwe, I., Abba, Y., Nwagbara, N., 2009.** Prevalence of *Besnoitia* cysts in pachydermatous skin lesions of cattle in Northeastern Nigeria. *Nig. J. Exp. Appl. Biol.* 10, 31-36.
- **Irigoién, M., Del Cacho, E., Gallego, M., López-Bernad, F., Quilez, J., Sanchez-Acedo, C., 2000.** Immunohistochemical study of the cyst of *Besnoitia besnoiti*. *Vet. Parasitol.* 91, 1-6.
- **Jacobson, R.H., 1998.** Validation of serological assays for diagnosis of infectious diseases. *Rev. Sci. Tech.* 17, 507-526.
- **Jacquiet, P., Liénard, E., Franc, M., 2010.** Bovine besnoitiosis: Epidemiological and clinical aspects. *Vet. Parasitol.* 174, 30-36.
- **Janitschke, K., De Vos, A.J., Bigalke, R.D., 1984.** Serodiagnosis of bovine besnoitiosis by ELISA and immunofluorescence tests. *Onderstepoort. J. Vet. Res.* 51, 239-243.
- **Jellison, W.L., 1956.** On the nomenclature of *Besnoitia besnoiti*, a protozoan parasite. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 64, 268-270.
- **Juste, R.A., Cuervo, L.A., Marco, J.C., Oregui, L.M., 1990.** La besnoitiosis bovina, ¿desconocida en España?. *Medicina. Veterinaria.* 7, 613-618.
- **Kaggwa, E., Weiland, G., Rommel, M., 1979.** *Besnoitia besnoiti*, and *Besnoitia jellisoni*: a comparison of the indirect immunofluorescent antibody test (IFAT) and the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in diagnosis of *Besnoitia* infections in rabbits and in mice. *Bull. Anim. Health. Prod. Africa.* 27, 127-137.
- **Kiehl, E., Heydorn, A.O., Schein, E., Al-Rasheid, K.A., Selmair, J., Abdel-Ghaffar, F., Mehlhorn, H., 2010.** Molecular biological comparison of different *Besnoitia* species and stages from different countries. *Parasitol. Res.* 106, 889-894.
- **Krasov, V.M., Omarov, Z.K., Uvaliev, I.U., Khvan, M.V., 1975.** Besnoitiosis in animals of Kazakhstan. *Veterinariya.* 2, 65-70.
- **Krcmar, S., Mikuska, A., Merdic, E., 2006.** Response of Tabanidae (Diptera) to different natural attractants. *J. Vector Ecol.* 31, 262-265.

- **Krcmar**, S., Radolic, V., Lajos, P., Lukacevic, I., **2014**. Efficiency of colored modified box traps for sampling of tabanids. *Parasite*. 21, 67, 1-6.
- **Kumi-Diaka**, J., Wilson, S., Sanusi, A., Njoku, C.E., Osori, D.I., **1981**. Bovine besnoitiosis and its effect on the male reproductive system. *Theriogenology*. 16, 523-530.
- **Kutz**, S.J., Jenkins, E.J., Veitch, A.M., Ducrocq, J., Polley, L., Elkin, B., Lair, S., **2009**. The Arctic as a model for anticipating, preventing, and mitigating climate change impacts on host-parasite interactions. *Vet. Parasitol.* 163, 217-228.
- **Langenmayer**, M.C., Gollnick, N.S., Majzoub-Altweck, M., Scharr, J.C., Schares, G., Hermanns, W., **2015a**. Naturally acquired bovine besnoitiosis: histological and immunohistochemical findings in acute, subacute, and chronic disease. *Vet. Pathol.* 52, 476-488.
- **Langenmayer**, M., Gollnick, N., Scharr, J., Schares, G., Herrmann, D., Majzoub-Altweck, M., Hermanns, W., **2015b**. *Besnoitia besnoiti* infection in cattle and mice: ultrastructural pathology in acute and chronic besnoitiosis. *Parasitol. Res.* 114, 955-963.
- **Le Blancq**, S.M., Desser, S.S., Shkap, V., Pipano, E., **1986**. *Besnoitia* strain differentiation using isoenzyme electrophoresis. 72, 475-476.
- **Lee**, H.S., Bak, U.B., Moon, M.H., Shin, J.U., **1970**. Studies on bovine besnoitiosis in Korea. A survey on incidence in the enzootic region. *Korean J. Parasitol* 8, 76-80.
- **Legrand**, P., **2003**. La besnoitiose bovine en Ariège. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de Toulouse, Francia.
- **Leighton**, F.A., **Gajadhar**, A.A., **2001**. Tissue-Inhabiting Protozoans: *Besnoitia* spp. and Besnoitiosis. In: *Parasitic diseases of wild mammals*. Iowa State University Press, pp. 468-478.
- **Leitao**, J.L.D.S., **1949**. Globidiose bovina por *Globidium besnoiti*. *Rev. De Med. Vet.* 44, 152-156.
- **Lesser**, M., Braun, U., Deplazes, P., Gottstein, B., Hilbe, M., Basso, W., **2012**. First cases of besnoitiosis in cattle in Switzerland. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 154, 469-474.
- **Levine**, N.D., **1961**. Protozoan parasites of domestic animals and of man. Minneapolis, MN, 1-412 pp.
- **Lewis**, R.J., **1989**. *Besnoitia* infection in Woodland Caribou. *Canad. Vet. J.* 30, 436.
- **Lewis**, R., **1992**. *Besnoitia* infection in game-farmed reindeer: A trial to determine susceptibility of domestic cattle and mule deer. *Can. Vet. J.* 33, 76-77.
- **Liénard**, E., Salem, A., Grisez, C., Prévot, F., Bergeaud, J.P., Franc, M., Gottstein, B., Alzieu, J.P., Lagalisse, Y., Jacquiet, P., **2011**. A longitudinal study of *Besnoitia besnoiti* infections and

- seasonal abundance of *Stomoxys calcitrans* in a dairy cattle farm of southwest France. Vet. Parasitol. 177, 20-27.
- **Liénard**, E., Salem, A., Jacquet, P., Grisez, C., Prevot, F., Blanchard, B., Bouhsira, E., Franc, M., **2012**. Development of a protocol testing the ability of *Stomoxys calcitrans* (Linnaeus, 1758) (Diptera: Muscidae) to transmit *Besnoitia besnoiti* (Henry, 1913) (Apicomplexa: Sarcocystidae). Parasitol. Res. 112, 479-486.
 - **Liénard**, E., Pop, L., Prevot, F., Grisez, C., Mallet, V., Raymond-Letron, I., Bouhsira, E., Franc, M., Jacquet, P., **2015**. Experimental infections of rabbits with proliferative and latent stages of *Besnoitia besnoiti*. Parasitol. Res. 114, 3815-3826.
 - **López**, J., Grau-Roma, L., Martínez, J., Majó, N., Marco, A., Castillo, A., Domingo, M., **2012**. Histopathological findings in animals affected by bovine besnoitiosis, with special focus on male genital organs. J. Comp. Pathol. 146, 48.
 - **Lunde**, M.N., **Jacobs**, L., **1963**. *Toxoplasma* hemagglutination and dye test antibodies in experimentally infected rats. J. Parasitol. 49, 932-936.
 - **Madubata**, C., Dunams-Morel, D.B., Elkin, B., Oksanen, A., Rosenthal, B.M., **2012**. Evidence for a recent population bottleneck in an Apicomplexan parasite of caribou and reindeer, *Besnoitia tarandi*. Infect. Genet. Evol. 12, 1605-1613.
 - **Malta**, M., **Silva**, M., **1991**. Besnoitiose no Alentejo. In: IV Jornadas de Medicina Veterinaria. Lisboa, Portugal.
 - **Mansfield**, L.S., Schott, H.C., Murphy, A.J., Rossano, M.G., Tanhauser, S.M., Patterson, J.S., Nelson, K., Ewart, S.L., Marteniuk, J.V., Bowman, D.D., Kaneene, J.B., **2001**. Comparison of *Sarcocystis neurona* isolates derived from horse neural tissue. Vet. Parasitol. 95, 167-178.
 - **Marcelino**, E., Martins, T.M., Morais, J.B., Nolasco, S., Cortés, H., Hemphill, A., Leitao, A., Novo, C., **2011**. *Besnoitia besnoiti* protein disulfide isomerase (BbPDI): molecular characterization, expression and in silico modelling. Exp. Parasitol. 129, 164-174.
 - **Marcén-Seral**, J.M., **2011**. Las especies felina y canina como potenciales hospedadores definitivos y transmisores de *Besnoitia besnoiti*: infección experimental en el gato y en el perro. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria de Zaragoza, España.
 - **Marotel**, M., **1912**. Discussion of paper by Besnoit e Robin. Bull. et Mem. de la Soc. des Sciences Vet. de Lyon et de la Soc. de Med. Vet. de Lyon e du Sud-Est. 15, 196-217.
 - **McCully**, R.M., Basson, P.A., Van Niekerk, J.W., Bigalkie, R.D., **1966**. Observations on *Besnoitia* cysts in the cardiovascular system of some wild antelopes and domestic cattle. Onderstepoort J. Vet. Res. 33, 245-276.

- **Mehlhorn**, H., Klimpel, S., Schein, E., Heydorn, A.O., Al-Quraishy, S., Selmair, J., **2009**. Another African disease in Central Europa: besnoitiosis of cattle. Light and electron microscopical study. *Parasitol. Res.* 104, 861-868.
- **Millán**, J., Sobrino, R., Rodríguez, A., Oleaga, Á., Gortázar, C., Schares, G., **2012**. Large-scale serosurvey of *Besnoitia besnoiti* in free-living carnivores in Spain. *Vet. Parasitol.* 190, 241-245.
- **Moré**, G., Abrahamovich, P., Jurado, S., Bacigalupe, D., Marin, J.C., Rambeaud, M., Venturini, L., Venturini, M.C., **2011**. Prevalence of *Sarcocystis* spp. in Argentinean cattle. *Vet. Parasitol.* 177, 162-165.
- **Moreno**, B., Collantes-Fernández, E., Villa, A., Navarro, A., Regidor-Cerrillo, J., Ortega-Mora, L.M., **2012**. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infections in ovine and caprine abortions. *Vet. Parasitol.* 187, 312-318.
- **Namazi**, F., Oryan, A., Sharifiyazdi, H., **2011**. Genetic characterization of the causative agent of besnoitiosis in goats in Iran on the basis of internal transcribed spacer rDNA and its comparison with *Besnoitia* species of other hosts. *Parasitol. Res.* 108, 633-638.
- **Nasir**, A., Lanyon, S.R., Schares, G., Anderson, M.L., Reichel, M.P., **2012**. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Besnoitia besnoiti* in South Australian beef and dairy cattle. *Vet. Parasitol.* 186, 480-485.
- **Ness**, S.L., Peters-Kennedy, J., Schares, G., Dubey, J.P., Mittel, L.D., Mohammed, H.O., Bowman, D.D., Felipe, M.J., Wade, S.E., Shultz, N., Divers, T.J., **2012**. Investigation of an outbreak of besnoitiosis in donkeys in northeastern Pennsylvania. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 240, 1329-1337.
- **Ness**, S.L., Schares, G., Peters-Kennedy, J., Mittel, L.D., Dubey, J.P., Bowman, D.D., Mohammed, H.O., Divers, T.J., **2014**. Serological diagnosis of *Besnoitia bennetti* infection in donkeys (*Equus asinus*). *J. Vet. Diagn. Invest.* 26, 778-782.
- **Neuman** and **Nobel**, **1960**. Globidiosis of cattle and sheep in Israel. *Ref. Vet.* 17, 101-103.
- **Neuman**, M., **1962a**. An outbreak of besnoitiasis in cattle. *Refuah. Vet.* 19, 106.
- **Neuman**, M., **1962b**. The experimental infection of the gerbil (*Meriones tristami shawii*) with *Besnoitia besnoiti*. *Refuah. Vet.* 19, 188.
- **Neuman**, M., **1972a**. Serological survey of *Besnoitia besnoiti* (Marotel 1912) infection in Israel by immunofluorescence. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 19, 391-396.
- **Neuman**, M., **1972b**. Pathological changes causing sterility in bulls affected with *Besnoitia besnoiti*. *J. Protozool.* 19, 54.
- **Nganga**, C.J., **Kasigazi**, S., **1994**. Caprine besnoitiosis: studies on the experimental intermediate hosts and the role of the domestic cat in transmission. *Vet. Parasitol.* 52, 207-210.

- **Nganga, C.J., Kanyari, P.W., Munyua, W.K., 1994.** Isolation of *Besnoitia wallacei* in Kenya. Vet. Parasitol. 52, 203-206.
- **Nikolaevskii, L.D., 1961.** In: Disease of reindeer. 2nd Ed. Israel Program for Scientific Translations. pp 266-268.
- **Njagi, O.N., Ndarathi, C.M., Nyaga, P.N., Munga, L.K., 1998.** An epidemic of besnoitiosis in cattle in Kenya. Onderstepoort J. Vet. Res. 65, 133-136.
- **Njenga, J., Bwangamoi, O., Mutiga, E., Kangethe, E., Mugeru, G., 1993.** Preliminary findings from an experimental study of caprine besnoitiosis in Kenya. Vet. Res. Commun. 17, 203-208.
- **Njenga, M., Bwangamoi, O., Kangethe, E.K., Mugeru, G.M., Mutiga, E.R., 1995.** Comparative ultrastructural studies on *Besnoitia besnoiti* and *Besnoitia caprae*. Vet. Res. Commun. 19 (4), 295-308.
- **Njenga, M., Munyua, S., Bwangamoi, O., Kangethe, E., Mugeru, G., Mutiga, E., Wamukoya, J., 1999.** Prevalence of besnoitiosis in domestic ruminants in Kenya: a preliminary survey. J. S. Afr. Vet. Assoc. 70, p. 151-153.
- **Nobel, T., Neumann, M., Klopfer, U., Perl, S., 1977.** Cysts of *Besnoitia besnoiti* in genital organs of the cow. Bulletin de l'Academie Veterinaire. 50, 569-574.
- **Nobel, T., Klopfer, U., Perl, S., Nyska, A., Neumann, M., Brenner, M. 1981.** Histopathology of genital besnoitiosis of cows in Israel. Vet. Parasitol. 8, 271-276.
- **Olias, P., Schade, B., Mehlhorn, H., 2011.** Molecular pathology, taxonomy and epidemiology of *Besnoitia* species (Protozoa: Sarcocystidae). Infect. Genet. Evol. 11, 1564-1576.
- **Oryan, A., Azizi, S., 2008.** Ultrastructure and pathology of *Besnoitia caprae* in the naturally infected goats of Kerman, East of Iran. Parasitol. Res. 102, 1171-1176.
- **Oryan, A., Namazi, F., Namavari, M., Sharifiyazdi, H., Moraveji, M., 2010.** Comparison of the pathogenesis of two isolates of *Besnoitia caprae* in inbred BALB/c mice. Vet. Res. Commun. 34, 423-434.
- **Oryan, A., Silver, I.A., Sadoughifar, R., 2014.** Caprine besnoitiosis: an emerging threat and its relationship to some other infections of ungulates by *Besnoitia* species. Res. Vet. Sci. 97, 1-7,
- **Panadero, R., Paineira, A., López, C., Vázquez, L., Paz, A., Díaz, P., Dacal, V., Cienfuegos, S., Fernández, G., Lago, N., Díez-Banos, P., Morondo, P., 2010.** Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in wild and domestic ruminants sharing pastures in Galicia (Northwest Spain). Res. Vet. Sci. 88, 111-115.

- **Papadopoulos, E., Arsenos, G., Ptochos, S., Katsoulos, P., Oikonomou, G., Karatzia, M., Karatzias, H., 2014.** First report of *Besnoitia besnoiti* seropositive cattle in Greece. J. Hellenic. Vet. Med. Soc. 65, 115-120.
- **Pedraza-Díaz, S., Marugán-Hernández, V., Collantes-Fernández, E., Regidor-Cerrillo, J., Rojo-Montejo, S., Gómez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M., 2009.** Microsatellite markers for the molecular characterization of *Neospora caninum*: application to clinical samples. Vet. Parasitol. 166, 38-46.
- **Pérez, J.M., Granados, J.E., Soriguer, R.C., Fandos, P., Márquez, F.J., Crampe, J.P., 2002.** Distribution, status and conservation problems of the Spanish Ibex, *Capra pyrenaica* (Mammalia: Artiodactyla). Mamm. Rev. 32, 26-39.
- **Pérez-Zaballos, F.J., Ortega-Mora, L.M., Álvarez-García, G., Collantes-Fernández, E., Navarro-Lozano, V., García-Villada, L., Costas, E., 2005.** Adaptation of *Neospora caninum* isolates to cell-culture changes: an argument in favor of its clonal population structure. J. Parasitol. 91, 507-510.
- **Peteshev, V.M., Galuzo, I.G., Polomoshnov, A.P., 1974.** Cats-definitive hosts of *Besnoita* (*Besnoitia besnoiti*) (In Russian). Azv Akad Nauk Kazakh SSR B 1, 33-38.
- **Pols, J.W., 1954.** The artificial transmission of *Globidium besnoiti* (Marotel 1912) to cats and rabbits. J. S. Afr. Vet. Assoc. 25, 37-44.
- **Pols, J.W., 1960.** Studies on bovine besnoitiosis with special reference to the aetiology. Onderstepoort. J. Vet. Res. 28, 265-356.
- **Regidor-Cerrillo, J., Pedraza-Díaz, S., Gómez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M., 2006.** Multilocus microsatellite analysis reveals extensive genetic diversity in *Neospora caninum*. J. Parasitol. 92, 517-524.
- **Regidor-Cerrillo, J., Gómez-Bautista, M., Del Pozo, I., Jiménez-Ruiz, E., Aduriz, G., Ortega-Mora, L.M., 2010.** Influence of *Neospora caninum* intra-specific variability in the outcome of infection in a pregnant BALB/c mouse model. Vet. Res. 41, 52.
- **Regidor-Cerrillo, J., Álvarez-García, G., Pastor-Fernández, I., Marugán-Hernández, V., Gómez-Bautista, M., Ortega-Mora, L.M., 2012.** Proteome expression changes among virulent and attenuated *Neospora caninum* isolates. J. Proteomics. 75, 2306-2318.
- **Rehbinder, C., Elvander, M., Nordkvist, M., 1981.** Cutaneous besnoitiosis in a Swedish reindeer (*Rangifer tarandus* L). Nordisk. Veterinaer. Medicin. 33, 270-272.
- **Rinaldi, L., Maurelli, M.P., Musella, V., Bosco, A., Cortés, H., Cringoli, G., 2013.** First cross-sectional serological survey on *Besnoitia besnoiti* in cattle in Italy. Parasitol. Res. 112, 1805-1807.
- **Rodríguez-Sánchez, B., Gortázar, C., Ruiz-Fons, F., Sánchez-Vizcaino, J.M., 2010.** Bluetongue virus serotypes 1 and 4 in red deer, Spain. Emerg. Infect. Dis. 16, 518-520.

- **Rommel, M., 1978.** New knowledge on the biology of *Coccidia*, *Toxoplasma*, *Sarcosporidia* and *Besnoitia*. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 88, 112-117.
- **Rostaher, A., Mueller, R.S., Majzoub, M., Schares, G., Gollnick, N.S., 2010.** Bovine besnoitiosis in Germany. Vet. Dermatol. 29, 321-334.
- **Sahun, S., 1998.** La besnoitiose bovine en France: Mise au point d'un test ELISA et enquête sur le terrain. Tesis Doctoral, Facultad de Veterinaria de Toulouse, Francia .
- **Sambo, S., Ibrahim, N., Esievo, K., Kazeem, H., 2014.** Prevalence of *Besnoitia besnoiti* antibodies in bovine sera and milk in Northern Nigeria. Sokoto Journal of Veterinary Sciences. 12, 29-35.
- **San-Miguel, J.M., Gutiérrez-Expósito, D., Aguado-Martínez, A., González-Zotes, E., Pereira-Bueno, J., Gómez-Bautista, M., Rubio, P., Ortega-Mora, L.M., Collantes-Fernández, E., Álvarez-García, G., aceptado.** Effect of different ecosystems and management practices on *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* infections in Spanish wild ruminants. J. Wildl. Dis.
- **Sannusi, A., 1991.** A simple field diagnostic smear test for bovine besnoitiosis. Vet. Parasitol. 39, 185-188.
- **Santiago-Moreno, J., López-Sebastián, A., 2010.** Ungulados silvestres en España: biología y tecnologías reproductivas para su conservación y aprovechamiento cinegético. Monografías INIA. Serie Medioambiental Nº2.
- **Schares, G., Basso, W., Majzoub, M., Cortés, H.C., Rostaher, A., Selmair, J., Hermanns, W., Conraths, F.J., Gollnick, N.S., 2009.** First in vitro isolation of *Besnoitia besnoiti* from chronically infected cattle in Germany. Vet. Parasitol. 163, 315-322.
- **Schares, G., Basso, W., Majzoub, M., Rostaher, A., Scharr, J.C., Langenmayer, M.C., Selmair, J., Dubey, J.P., Cortés, H.C., Conraths, F.J., Gollnick, N.S., 2010.** Comparative evaluation of immunofluorescent antibody and new immunoblot tests for the specific detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti* tachyzoites and bradyzoites in bovine sera. Vet. Parasitol. 171, 32-40.
- **Schares, G., Basso, W., Majzoub, M., Rostaher, A., Scharr, J.C., Langenmayer, M.C., Selmair, J., Dubey, J.P., Cortés, H.C., Conraths, F.J., Haupt, T., Purro, M., Raeber, A., Buholzer, P., Gollnick, N.S., 2011a.** Evaluation of a commercial ELISA for the specific detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti*. Vet. Parasitol. 175, 52-59.
- **Schares, G., Maksimov, A., Basso, W., More, G., Dubey, J.P., Rosenthal, B., Majzoub, M., Rostaher, A., Selmair, J., Langenmayer, M.C., Scharr, J.C., Conraths, F.J., Gollnick, N.S., 2011b.** Quantitative real time polymerase chain reaction assays for the sensitive detection of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle. Vet. Parasitol. 178, 208-216.

- **Schares, G.,** Langenmayer, M.C., Scharr, J.C., Minke, L., Maksimov, P., Maksimov, A., Schares, S., Barwald, A., Basso, W., Dubey, J.P., Conraths, F.J., Gollnick, N.S., **2013.** Novel tools for the diagnosis and differentiation of acute and chronic bovine besnoitiosis. *Int. J. Parasitol.* 43, 143-154.
- **Schulz, K.C.A., 1960.** A report on naturally acquired besnoitiosis in bovines with special reference to its pathology. *J. S. Afr. Vet. Med. Assoc.* 31, 21-35.
- **Sekoni, V.,** Sanusi, A., Abatan, M., Oyedipe, E., Rekwot, P., Eduvie, L., **1992.** Loss of libido and terminal sterility in a Friesian bull naturally infected with *Besnoitia besnoiti* in Northern Nigeria: A case report. *Theriogenology.* 37, 533-549.
- **Senaud, J.,** Mehlhorn, H., Scholtyseck, E., **1974.** *Besnoitia jellisoni* in macrophages and cysts from experimentally infected laboratory mice. *J. Protozool.* 21, 715-720.
- **Serrano, M., 2014.** Análisis de la situación del vacuno de carne. *Albaitaritz.* 62, 26-31.
- **Serrano-Martínez, E.,** Ferre, I., Martínez, A., Osoro, K., Mateos-Sanz, A., Del-Pozo, I., Adúriz, G., Tamargo, C., Hidalgo, C.O., Ortega-Mora, L.M., **2007a.** Experimental neosporosis in bulls: Parasite detection in semen and blood and specific antibody and interferon-gamma responses. *Theriogenology.* 67, 1175-1184.
- **Serrano-Martínez, E.,** Ferre, I., Osoro, K., Adúriz, G., Mota, R.A., Martínez, A., Del-Pozo, I., Hidalgo, C.O., Ortega-Mora, L.M., **2007b.** Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers and cows using contaminated semen with different numbers of tachyzoites. *Theriogenology.* 67, 729-737.
- **Shaowen, Z.,** Danba, G., Xueliang, L., **1981.** The research report of the bovine globidiosis disease, China. *China Yak.* 12, 35-35.
- **Shkap, V.,** Ungar-Waron, H., Pipano, E., Greenblatt, C., **1984.** Enzyme linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Besnoitia besnoiti* in cattle. *Trop. Anim. Hlth Prod.* 16, 233-238.
- **Shkap, V.,** De Waal, D.T., Potgieter, F.T., **1985.** Chemotherapy of experimental *Besnoitia besnoiti* infection in rabbits. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 52, 289.
- **Shkap, V., 1986.** Antigenicity of *Besnoitia besnoiti* with special reference to prophylactic immunization. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria de Jerusalem, Israel.
- **Shkap, V.,** Pipano, E., Greenblatt, C., **1987a.** Cultivation of *Besnoitia besnoiti* and evaluation of susceptibility of laboratory animals to cultured parasites. *Vet. Parasitol.* 23, 169-178.
- **Shkap, V.,** Pipano, E., Ungar-Waron, H., **1987b.** *Besnoitia besnoiti*: chemotherapeutic trials *in vivo* and *in vitro*. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays. Trop.* 40, 259-264.
- **Shkap, V.,** Yakobson, B.A., Pipano, E., **1988.** Transmission and scanning electron microscopy of *Besnoitia besnoiti*. *Int. J. Parasitol.* 18 (6), 761-766.

- **Shkap**, V., Ungar-Waron, H., Pipano, E., **1989**. Soluble antigens from culture-grown *Besnoitia besnoiti* endozoites. *Vet. Parasitol.* 34, 165-170.
- **Shkap**, V., Ungar-Waron, H., Pipano, E., **1990**. Identification and partial purification of soluble antigens from culture-grown *Besnoitia besnoiti* endozoites. *Rev. Elev. Med. Vet. Pays. Trop.* 43, 63-68.
- **Shkap**, V., Pipano, E., Marcus, S., Krigel, Y., **1994**. Bovine besnoitiosis: transfer of colostral antibodies with observations possibly relating to natural transmission of the infection. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 61, 273-275.
- **Shkap**, V., Pipano, E., Zwernemann, B., **1995**. Activity of a monoclonal antibody against *Besnoitia besnoiti* endozoites. *Vet. Res.* 26, 328-334.
- **Shkap**, V., Reske, A., Pipano, E., Fish, L., Baszler, T., **2002**. Immunological relationship between *Neospora caninum* and *Besnoitia besnoiti*. *Vet. Parasitol.* 106, 35-43.
- **Smith**, D.D., **Frenkel**, J., **1977**. *Besnoitia darlingi* (Protozoa: Toxoplasmatinae): cyclic transmission by cats. *J. Parasitol.* 63, 1066-1071.
- **Sobrinho**, R., Cabezón, O., Millán, J., Pabon, M., Arnal, M.C., Luco, D.F., Gortázar, C., Dubey, J.P., Almería, S., **2007**. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in wild carnivores from Spain. *Vet. Parasitol.* 148, 187-192.
- **Sobrinho**, R., Dubey, J.P., Pabón, M., Linarez, N., Kwok, O.C., Millán, J., Arnal, M.C., Luco, D.F., Lopez-Gatius, F., Thulliez, P., Gortazar, C., Almeria, S., **2008**. *Neospora caninum* antibodies in wild carnivores from Spain. *Vet. Parasitol.* 155, 190-197.
- **Soria-López**, N., Zafra-Leva, R., Pérez-Arévalo, J., Díez de Castro, E., **2011**. Besnotiosis en una explotación de asno andaluz. En el XII Congreso Internacional de Medicina y Cirugía Equina, Sevilla, España.
- **Stieve**, E., Beckmen, K., Kania, S.A., Widner, A., Patton, S., **2010**. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibody prevalence in Alaska Wildlife. *J. Wildl. Dis.* 46, 348-355.
- **Su**, C., Shwab, E.K., Zhou, P., Zhu, X.Q., Dubey, J.P., **2010**. Moving towards an integrated approach to molecular detection and identification of *Toxoplasma gondii*. *Parasitology*. 137, 1-11.
- **Tadros**, W., **Laarman**, J.J., **1982**. Besnoitiosis and besnoitian isosporiasis. *Adv. Parasitol.* 20, 335-345.
- **Talafha**, A.Q., Al-Majali, A.M., Ababneh, M.M., Abutarbush, S.M., **2015**. Epidemiologic study on *Besnoitia besnoiti* infection in dairy herds in Jordan. *Parasitol. Res.* 114, 2491-2497.
- **Tenter**, A.M., Barta, J.R., Beveridge, I., Duszynski, D.W., Mehlhorn, H., Morrison, D.A., Thompson, R.C., Conrad, P.A., **2002**. The conceptual basis for a new classification of the coccidia. *Int. J. Parasitol.* 32, 595-616.

- **Thrusfield, M., Ortega, C., de Blas, I., Noordhuizen, J.P., Frankena, K., 2001.** WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet. Rec.* 148, 567-572.
- **Uvaliev, I.U., Baigaziev, K.K., 1979.** The treatment of *Besnoitia* infection in animals. *Mater respublikans*, 185-190.
- **Uzeda, R.S., Andrade, M.R., Corbellini, L.G., Antonello, A.M., Vogel, F.S., Gondim, L.F., 2014.** Frequency of antibodies against *Besnoitia besnoiti* in Brazilian cattle. *Vet. Parasitol.* 199, 242-246.
- **Vandenbroucke, J.P., von Elm, E., Altman, D.G., Gotzsche, P.C., Mulrow, C.D., Pocock, S.J., Poole, C., Schlesselman, J.J., Egger, M., STROBE Initiative, 2007.** Strengthening the reporting of observational studies in epidemiology (STROBE): explanation and elaboration. *Epidemiology.* 18, 805-835.
- **Vanhoudt, A., Pardon, B., De Schutter, P., Bosseler, T., Sarre, C., Vercruysse, J., Deprez, P., 2015.** First confirmed case of bovine besnoitiosis in an imported bull in Belgium. *Vlaams Diergeneesk. Tijdschr.* 84, 205-211.
- **Vogelsang, E.G., Gallo, P., 1941.** *Globidium besnoiti* (Marotel, 1912) y habronemosis cutanea en bovinos de Venezuela. *Rev. Med. Vet. Parasitol.* 3, 153-155.
- **Vors, L.S., Boyce, M.S., 2009.** Global declines of caribou and reindeer. *Global Change Biol.* 15, 2626-2633.
- **Waap, H., Cardoso, R., Marcelino, E., Malta, J., Cortés, H., Leitao, A., 2011.** A modified agglutination test for the diagnosis of *Besnoitia besnoiti* infection. *Vet. Parasitol.* 178, 217-222.
- **Waap, H., Leitao, A., Nunes, T., Cortés, H., Vaz, Y., 2012.** Bovine besnoitiosis in the Alentejo region. In: I International Meeting on Apicomplexan Parasites in Farm Animals. Lisbon, Portugal, pp. 76.
- **Waap, H., Nunes, T., Cortés, H., Leitao, A., Vaz, Y., 2014.** Prevalence and geographic distribution of *Besnoitia besnoiti* infection in cattle herds in Portugal. *Parasitol. Res.* 113, 3703-3711.
- **Waap, H., 2015.** Epidemiologia e diagnóstico da besnoitiose bovina em Portugal. Tesis Doctoral, Facultad de Medicina Veterinária, Lisboa, Portugal .
- **Wallace, G.D., Frenkel, J.K., 1975.** *Besnoitia* species (Protozoa, Sporozoa, Toxoplasmatidae): recognition of cyclic transmission by cats. *Science.* 188, 369-371.
- **Walsh, C.P., Vemulapalli, R., Sriranganathan, N., Zajac, A.M., Jenkins, M.C., Lindsay, D.S., 2001.** Molecular comparison of the dense granule proteins GRA6 and GRA7 of *Neospora hughesi* and *Neospora caninum*. *Int. J. Parasitol.* 31, 253-258.
- **Wobeser, G., 1976.** Besnoitiosis in a Woodland Caribou. *J. Wildl. Dis.* 12, 566-571.

- **Zacarias, J.A., 2009.** Epidemiología (seroprevalencia y vectores) de la besnoitiosis bovina de las Sierras de Urbasa y Andía. Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria de Zaragoza, España.
- **Zasukhin, D.N., Akinshina, G.T., Kalyakin, V.N., Savina, M.A., Gracheva, L.I., 1973.** Paraziticheskie Prosteishie. Zooparazitologiya. 3, 7-62.
- **Zhang, H., Lee, E.G., Yu, L., Kawano, S., Huang, P., Liao, M., Kawase, O., Zhang, G., Zhou, J., Fujisaki, K., Nishikawa, Y., Xuan, X., 2011.** Identification of the cross-reactive and species-specific antigens between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* tachyzoites by a proteomics approach. Parasitol. Res. 109, 899-911.
- **Zolotareva, N.A., 1965.** Vestnik sel'skokhozyaistvennykh Nauk Alma-Ata. 3, 51-53.
- **PÁGINAS WEBS:**
 - www.magrama.gob.es
 - www.aragon.es